

Einfluss der intrinsischen Ausdauerkapazität  
auf die antioxidativen Systeme  
während einer kardialen Drucküberlastung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen  
Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Philip Ackermann

geboren am 02.04.1993 in Rudolstadt

Gutachter

1. Herr Univ.-Prof. Dr. med. Torsten Doerst, Universitätsklinikum Jena
2. Herr PD Dr. med. Sven Möbius-Winkler, Universitätsklinikum Jena
3. Herr PD Dr. med. Norman Mangner, Herzzentrum Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 08.05.2018

## Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis .....	4
2. Zusammenfassung .....	6
3. Einleitung .....	8
4. Ziele der Arbeit .....	13
5. Materialien und Methoden .....	14
5.1 Tiermodell .....	14
5.2 Transversale Aortenkonstriktion (TAC) und Echokardiographie .....	14
5.3 Probenaufarbeitung .....	14
5.4 Katalaseaktivität .....	15
5.5 Superoxid Dismutaseaktivität (SOD) .....	16
5.6 Glutathion Peroxidaseaktivität (GPx) .....	17
5.7 Quantitative Proteinbestimmung .....	18
5.8 Statistische Analysen .....	19
6. Ergebnisse .....	20
6.1 Etablierung der Verfahren zur Messung der Superoxid Dismutaseaktivität .....	20
6.2 Etablierung der Verfahren zur Messung der Katalaseaktivität .....	22
6.3 Etablierung der Verfahren zur Messung der Glutathion Peroxidaseaktivität .....	24
6.4 Ventrikelfunktion von HCR und LCR vor und nach Drucküberlastung .....	25
6.5 Antioxidative Enzymaktivitäten in HCR und LCR vor und nach Drucküberlastung .....	26
7. Diskussion .....	28
8. Schlussfolgerung .....	32
9. Literatur und Quellenverzeichnis .....	33
10. Anhang .....	42
10.1 Abbildungsverzeichnis .....	42
10.2 Tabellenverzeichnis .....	42
10.3 Protokoll Glutathion Peroxidase .....	43
10.4 Protokoll Superoxid Dismutase .....	48
10.5 Protokoll Katalase .....	53
10.6 Danksagung .....	58
10.7 Ehrenwörtliche Erklärung .....	59

## 1. Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance
BSA	Bovines Serum Albumin
Bzw.	beziehungsweise
Cu- Zn- SOD	Kupfer- Zink- Superoxid Dismutase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E/A	E/A- Ration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
FS	Fractional shortening
GPx	Glutathion Peroxidase
GSH	Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCL	Chlorwasserstoff/ Salzsäure
HCR	High Capacity Runners
HER <sub>2</sub>	human epidermal growth factor receptor 2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KCN	Kalium Cyanid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LCR	Low Capacity Runners
MAPK	Mitogen activated protein Kinase
Mn- SOD	Mangan- Superoxid Dismutase
MTP	Mikrotiterplatte
NADP	oxidiertes Nicotin- Adenin- Dinucleotid
NADPH	reduziertes Nicotin- Adenin- Dinucleotid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NF- B	nuclear factor of activated B- cells
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid Anion
OH <sup>-</sup>	Hydroxylradikal

---

<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>SD</b>	Sprague Dawley
<b>SOD</b>	Superoxid Dismutase
<b>TAC</b>	Transversale Aortenkonstriktion
<b>U</b>	Unit

## 2. Zusammenfassung

Organismen, welche auf einen starken oxidativen Metabolismus angewiesen sind, benötigen antioxidative Systeme zum Schutz ihrer zellulären Funktionen und Bestandteile vor oxidativem Stress. Bereits kleinste Schäden, bedingt durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), an Lipiden, Proteinen oder DNA können zu einer irreversiblen Beeinträchtigung von Stoffwechselwegen, Signaltransduktion, DNA- Replikation und damit auch zur Entstehung von Krankheiten führen. Dadurch wird deutlich, wie essentiell der Schutz der Zelle und ihrer Makromoleküle durch antioxidative Systeme ist. Die wichtigsten und effizientesten Enzyme sind die Superoxid Dismutase (SOD), Katalase und die Glutathion Peroxidase (GPx). Sie haben den größten Anteil an der Elimination der im oxidativen Metabolismus entstehenden ROS. Die Enzymaktivität kann bei höherem oxidativem Stress durch Steigerung der Genexpression erhöht werden. Ein Abfall oder Verlust der Funktion ist mit verschiedenen Erkrankungen, wie Myokardischämie und Arteriosklerose bei der SOD, Diabetes mellitus und chronische Granulomatosen bei der Katalase sowie Parkinson und Hepatitiden für die Glutathion Peroxidase, assoziiert.

Das Herz zählt zu den Organen, welche besonders stark oxidativ aktiv sind. Um Untersuchungen der antioxidativen Aktivität in diesem Gewebe zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit photometrische Messmethoden zur validen Detektion der Aktivitäten der SOD, Katalase und Glutathion Peroxidase etabliert. Anschließend sollten die Verfahren an Herzmuskelproben von Tieren mit unterschiedlicher genetischer Prädisposition zur körperlichen Leistungsfähigkeit angewandt werden. Hier sollte untersucht werden, wie sich die veränderte intrinsische Ausdauerkapazität auf die antioxidativen Enzymaktivitäten in einer durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz auswirkt.

Ratten mit hoher (HCR) und niedriger (LCR) intrinsischer körperlicher Leistungsfähigkeit wurden einer Drucküberlastung unterzogen. In der 23. Woche wurden die Tiere getötet und die Herzen entnommen. Im Anschluss erfolgte die Detektion der antioxidativen Enzymaktivitäten mittels der zuvor etablierten Methoden.

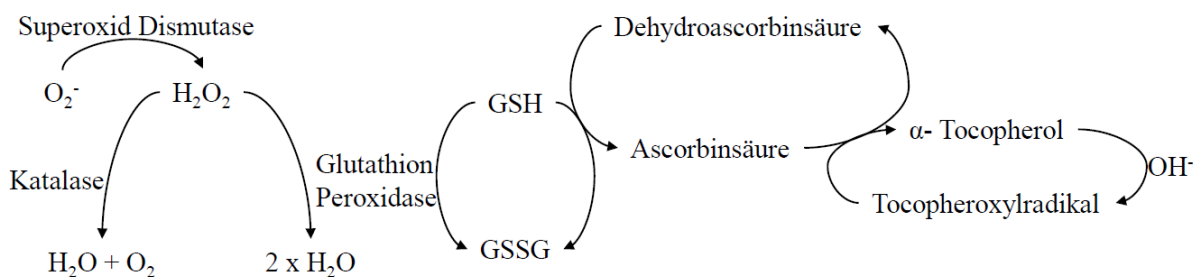
Vor der Anwendung der Verfahren zeigte ein Vergleich mit Werten aus der Literatur, dass die während der Etablierung gemessenen Aktivitäten publizierten Werten entsprachen.

Im Herzmuskel zeigten LCR sowohl für die Katalase, als auch für die Gesamt SOD eine höhere Aktivität als HCR. Die Aktivität der Glutathion Peroxidase war dagegen in HCR höher als in LCR. Eine Herzinsuffizienz führte sowohl in HCR, als auch LCR zu einer höheren Katalase-, Glutathion Peroxidase und Gesamt SOD- Aktivität. Für die SOD war jedoch nicht erkennbar, welche Isoform diese Unterschiede bedingt.

Tiere mit unterschiedlicher genetischer Prädisposition für körperliche Leistungsfähigkeit unterscheiden sich in der Aktivität ihrer enzymatischen antioxidativen Systeme. Eine Veränderung der intrinsischen körperlichen Leistungsfähigkeit hat keinen Einfluss auf die Steigerung der antioxidativen Kapazität in einer Herzinsuffizienz.

### 3. Einleitung

In zahlreichen Organismen existieren vielfältige Mechanismen zum Schutz ihrer Zellorganellen, Zellfunktion sowie Makromoleküle vor oxidativem Stress. Unter dem Begriff oxidativer Stress, versteht man den vermehrten Anfall reaktiver Sauerstoffspezies im Zuge eines Ungleichgewichts zwischen Entstehung und Elimination (Lee et al. 1998). Die Hauptvertreter der ROS sind das Superoxid- Anion ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das Hydroxylradikal ( $OH^\cdot$ ) (Schmidt et al. 2007). Werden diese nicht ausreichend eliminiert, kann dies zur Beeinträchtigung von Stoffwechsel- und Signalwegen oder der Schädigung zellulärer Makromoleküle führen (Vogt et al. 1998). Am bedeutendsten für den Zellschutz ist dabei das enzymatische antioxidative Schutzsystem, welches von der Superoxid Dismutase (SOD), der Katalase, sowie der Glutathion Peroxidase (GPx) gebildet wird (Chow 1988). Diese Enzyme formen gemeinsam mit anderen nicht enzymatischen Antioxidantien, wie  $\alpha$ - Tocopherol (Vitamin E), Ascorbinsäure (Vitamin C) sowie Glutathion (GSH), komplexe Reaktionskreisläufe (Mataix et al. 1998). Beispielsweise werden Superoxid-Anionen, welche im Laufe des aeroben Metabolismus entstehen, auf diesem Weg eliminiert (Abb. 1).



**Abb. 1: Auszug aus dem antioxidativen Schutzsystem der Zelle nach Chow (1988)**

Superoxid- Anion ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hydroxylradikal ( $OH^\cdot$ ), Glutathion (GSH), oxidiertes Glutathion (GSSG), Sauerstoff ( $O_2$ ), Wasser ( $H_2O$ ).

Die Umwandlung des Radikals in Wasserstoffperoxid erfolgt durch die SOD (McCord und Fridovich 1969). Im Anschluss daran stehen verschiedene Möglichkeiten für die Wasserstoffperoxid Elimination zur Verfügung. Ein Teil der Eliminierung erfolgt durch die Katalase in ein Molekül Wasser und Sauerstoff (Chance et al. 1979), sowie durch die Glutathion Peroxidase in zwei Moleküle Wasser (Mills 1959).



Die Glutathion Peroxidase ist eher mit der Elimination von kleineren ROS Mengen assoziiert, wohingegen die Katalase bei einem stärkeren oxidativen Stress essentiell zu sein scheint (Yan und Harding 1997). Des Weiteren ist die Glutathion Peroxidase in der Lage, neben Wasserstoffperoxid, ebenfalls Lipidperoxide und andere Hydroperoxide zu eliminieren (Ding et al. 1998).

Die Katalase zählt zu den effizientesten aktuell bekannten Enzymen, da sie nicht durch ihr Substrat, Wasserstoffperoxid, saturiert werden kann (Lledias et al. 1998). Sie kommt nahezu in allen Geweben vor, wobei Unterschiede zwischen den Aktivitäten bestehen. Den höchsten Katalaseanteil im menschlichen Organismus fand man in Leber- und Nierengewebe sowie Erythrozyten (Marklund et al. 1982). Bei Ratten und Mäusen hatten Erythrozyten den größten Anteil, gefolgt von Leber, Niere, Knochenmark und Herz (Aebi 1984). Obwohl entdeckt wurde, dass die Katalase nicht für alle Zelltypen lebensnotwendig ist, wurde ihr eine entscheidende Rolle bei der Adaptation von Zellen an oxidativen Stress zugesprochen (Hunt et al. 1998). Die katalysierte Reaktion zur Elimination von Wasserstoffperoxid ist entscheidend für den Schutz des Genoms und von Proteinen. Schriener et al. (2005) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass transgene Mäuse mit vermehrter humaner Katalase Expression in Peroxisomen, Mitochondrien, sowie dem Zellkern eine bis zu fünf Monate längere Lebensspanne sowie weniger kardiale Erkrankungen aufwiesen. Gleichmaßen wurde entdeckt, dass ein Katalasemangel in verschiedenen Geweben mit arterieller Hypertonie, Katarakt, chronischen Granulomatosen sowie Diabetes mellitus assoziiert ist (Yan und Harding 1997, Chang et al. 1998, Goth und Eaton 2000, Jiang et al. 2001).

Obwohl die Superoxid Dismutase bereits seit mehreren Jahren bekannt war, erhielt sie ihren Namen erst 30 Jahre später, als die von ihr katalysierte Reaktion, nämlich die Dismutation des Superoxid- Anions, entdeckt wurde (McCord und Fridovich 1969, Fridovich 1975). Die SOD kommt in allen Zellen und Geweben, welche auf einen aeroben Metabolismus angewiesen sind, vor (Westman und Marklund 1981). Zu den in Säugetieren aktuell bekannten Isoformen zählen die Kupfer- Zink- SOD (Cu- Zn), die Mangan- SOD (Mn) sowie die Extrazelluläre SOD (Weisiger und Fridovich 1973, Marklund 1982). Die beiden intrazellulären Typen des Enzyms sind in unterschiedlichen Zellkompartimenten zu finden. Die Cu- Zn- SOD ist im Zytosol eukaryotischer Zellen lokalisiert, die Mn- SOD in den Mitochondrien. Majima et al. (1998) fassten im Hinblick auf die SOD vielfältige Untersuchungsergebnisse zusammen. Sie beobachteten bei einem Mangel der Mn- SOD gesteigerte Mutationsraten und erhöhte Sauerstoffsensibilität bei Mikroorganismen, sowie eine sich früh ausbildende dilatative Kardiomyopathie bei Knock- out Mäusen. Außerdem führte Tumornekrosefaktor (TNF), ein Signalstoff im Rahmen lokaler beziehungsweise systemischer Entzündungsvorgänge, zu einer Steigerung der Mn- SOD Expression. Die Cu- Zn- SOD

blieb unbeeinflusst. In transgenen Mäusen verminderte die Expression humaner mitochondrialer SOD oxidative Lungenschäden, sowie die Kardiotoxizität von Doxorubicin, einem Chemotherapeutikum. Eine Überexpression humaner Cu- Zn- SOD verminderte die Ausdehnung und Folgen eines Schlaganfalls, Hirnödems und Herzinfarktes in transgenen Mäusen (Wang et al. 1998). Außerdem schützte sie vor Streptozotocin- induziertem Diabetes, sowie Lungenschäden im Rahmen einer hyperbaren Sauerstofftherapie (White et al. 1991, Kubisch et al. 1994). Die gestörte Funktion der Gesamt SOD wird mit der Ausdehnung von Ischämien, Arteriosklerose, Alzheimer und Diabetes mellitus in Verbindung gebracht (Furuta et al. 1995, Yan und Harding 1997, Petyaev et al. 1998, Wang et al. 1998).

Die Glutathion Peroxidase, welche zur Gruppe der Selenoproteine gehört, wurde erstmals in Erythrozyten entdeckt (Mills 1957, Hatfield und Gladyshev 2002). Ihre Funktion, nämlich Hämoglobin und andere zelluläre Makromoleküle vor ROS Schäden zu schützen wurden in diesem Zusammenhang untersucht (Mills und Randall 1958). Die Komplexität des Reaktionskreislaufes, an welchem die verschiedenen Substrate GSH,  $H_2O_2$ , NADPH und weiterhin die Glutathion Reduktase beteiligt sind, wurde erkannt (Mills 1959). Aktuell sind acht Isoformen der Glutathion Peroxidase bekannt, welche in verschiedenen Geweben lokalisiert sind (Kryukov et al. 2003, Utomo et al. 2004, Toppo et al. 2008). Die GPx<sub>1</sub> kommt in allen Geweben vor und hat die höchste Affinität für Wasserstoffperoxid, womit sie den größten Anteil am Schutz vor oxidativem Stress ausmacht (Brigelius-Flohe 2006). Am meisten wurde sie in Erythrozyten, Nieren- und Lebergewebe gefunden (Frampton et al. 1987). Eine weitere bedeutende Isoform stellt die GPx<sub>4</sub> dar. Diese wurde bei Ratten und Mäusen in allen Geweben, bei Menschen vor allem in Nieren-, sowie Hodengewebe nachgewiesen (Baek et al. 2007, Brigelius-Flohe 2013). Sie spielt eine besondere Rolle, da sie neben Wasserstoffperoxid in der Lage ist andere organische Peroxide sowie Lipidperoxide in biologischen Membranen zu eliminieren. Über die weiteren Isoformen ist aktuell weniger bekannt. Eine Überexpression der GPx<sub>1</sub> im Mausmodell zeigte eine erhöhte Toleranz gegenüber Reperfusionsschäden nach Myokardischämie (Yoshida et al. 1996, Ho et al. 1998). In Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des Wachstumsfaktorrezeptors HER<sub>2</sub> zu einer gesteigerten Aktivität der GPx<sub>1</sub> führt. In Folge dessen, war eine verminderte Kardiotoxizität des Chemotherapeutikums Doxorubicin sowie eine verbesserte ROS Eliminierung mit weniger Folgeschäden zu verzeichnen (Belmonte et al. 2015). Eine gestörte Aktivität der Glutathion Peroxidase ist des Weiteren mit Parkinson und Mammakarzinom, aber auch allergischen

Reaktionen auf Medikamente und Nahrungsmittel assoziiert (Malmgren R. G. 1986, Pearson et al. 1991, Offen et al. 1998, Lee et al. 1998). Die Keshan- Krankheit, eine besondere Kardiomyopathie, entsteht im Rahmen verminderter Selenoproteinspiegel bei Selenmangel (Flohe L. 2001).

Die Entstehung oxidativer Metabolite gehört zu den physiologischen Prozessen im Rahmen des aeroben Metabolismus. Erst wenn ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung und der Elimination besteht, folgt eine Störung der zellulären Homöostase (Cross et al. 1987). Diesem Ungleichgewicht können verschiedene Entitäten zu Grunde liegen. Wie zuvor beschrieben, bedingen Störungen des antioxidativen Schutzsystems eine unzureichende Elimination. Für eine gesteigerte ROS Entstehung können verschiedene Prozesse verantwortlich sein. Die Mitochondrien stellen, aufgrund ihres hohen aeroben Metabolismus, die größte intrazelluläre ROS Quelle dar (Droge 2002). Mitochondriale Dysfunktion, gekoppelt an eine gesteigerte ROS Produktion, ist mit verschiedenen Krankheiten sowie dem Alterungsprozess assoziiert (Pieczenik und Neustadt 2007, Navarro und Boveris 2007, Alfadda und Sallam 2012). Ein Beispiel dafür stellt die Herzinsuffizienz dar. Es wurde entdeckt, dass ein erhöhter ROS Spiegel im Herzmuskelgewebe sowie dem Gefäßsystem mit einer Herzinsuffizienz assoziiert ist (Landmesser et al. 2002, Heymes et al. 2003, Giordano 2005, Ijsselmuiden et al. 2008, Maack und Bohm 2011). Diese Erhöhung ist nicht nur auf eine vermehrte Produktion aufgrund des verstärkten Energiebedarfs, sondern auch auf eine vermehrte Emission von ROS aus den Mitochondrien sowie eine nicht ausreichende Elimination zurückzuführen (Nickel et al. 2014, Munzel et al. 2015). Eine gestörte Ionenhomöostase der Kardiomyozyten bedingt eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Calcium- Homöostase mit vermehrter ROS Emission (Maack et al. 2006, Kohlhaas und Maack 2013). Munzel et al. (2015) stellten dar, dass eine erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems, sowie des Renin- Angiotensin- Aldosteron- Systems (RAAS), eines hormonellen Kreislafs zur Blutdrucksteuerung, die ROS Entstehung in einer Herzinsuffizienz begünstigen. Des Weiteren erkannten sie, dass körperliche Aktivität sich positiv auf die beiden Systeme und damit auf die Herzinsuffizienz auswirkte. Weiterhin wurde entdeckt, dass besonders die Mitochondrien für Anpassungsvorgänge an eine gesteigerte körperliche Aktivität auf zellulärer Ebene verantwortlich sind (Hepple 2000). Um die Vorgänge im Rahmen der Adaptation an Veränderungen der Ausdauerkapazität zu untersuchen, entstanden verschiedene Tiermodelle. Manche Modelle beschäftigten sich allein mit der Auswirkung eines Trainings innerhalb einer Generation, andere beleuchteten genetische Ausprägungen. Im Kontext der Untersuchung genetischer Prädisposition für körperliche Leistungsfähigkeit entstand das High Capacity/ Low Capacity Runners (HCR/ LCR) Tiermodell (Koch und Britton 2001, Britton und Koch 2001). Dafür wurden Ratten einem Test maximaler Ausdauerkapazität unterzogen und

jeweils die besten Läufer untereinander und entsprechend die schlechtesten untereinander selektiv verpaart. Die nach 33 Generationen daraus resultierenden guten Läufer, die HCR, wurden mit Tieren verglichen, welche eine geringe Ausdauerkapazität aufweisen, den LCR. Am Ende standen sich zwei Populationen mit unterschiedlicher genetischer Prädisposition gegenüber. Tweedie et al. (2011) untersuchten im Rahmen dieses Tiermodells die Aktivität der antioxidativen Enzyme im Skelettmuskelgewebe. HCR zeigten sowohl im *Musculus soleus*, als auch im *Musculus gastrocnemius* eine höhere SOD Aktivität, als LCR. Die Katalase, sowie Glutathion Peroxidase zeigten eine gering erhöhte Aktivität in HCR. Wie sich die antioxidativen Enzyme im Herzmuskelgewebe von HCR sowie LCR verhalten und welchen Beitrag sie in einer Herzinsuffizienz haben, ist aktuell noch nicht untersucht worden. Es besteht wahrscheinlich ein Zusammenhang zwischen der Herzleistung und damit auch dem aeroben Metabolismus sowie der ROS Produktion des Herzmuskels und den antioxidativen Enzymaktivitäten. Dies suggeriert, dass eine Herzinsuffizienz zu einer veränderten antioxidativen enzymatischen Antwort führt.

## 4. Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten photometrische Messverfahren zur validen und reproduzierbaren Detektion der Aktivitäten der SOD, Katalase und Glutathion Peroxidase etabliert werden. Die Etablierung orientierte sich an Methoden aus anderen Arbeiten, wobei häufig verwendete Verfahren gewählt wurden. Es sollte besonders darauf geachtet werden, valide Messungen im Herzmuskelgewebe zu ermöglichen. Damit die Methoden problemlos in anderen Versuchskonstellationen verwendet werden können, wurden für jedes Verfahren Protokolle erstellt.

Aktuell ist noch nicht genau geklärt, wie sich eine Herzinsuffizienz auf die Aktivität der SOD, Katalase sowie der Glutathion Peroxidase auswirkt. Außerdem existieren momentan im Hinblick auf die genetische Prädisposition für körperliche Leistungsfähigkeit nur Ergebnisse zur antioxidativen Aktivität des Skelettmuskelgewebes. Daher sollten die etablierten Methoden im Kontext einer Herzinsuffizienz im HCR/ LCR- Tiermodell Anwendung finden und offene Fragen geklärt werden. Es sollte untersucht werden, wie die Enzymaktivität der Antioxidantien während einer Herzinsuffizienz durch unterschiedliche genetische Prädisposition für intrinsische Ausdauerkapazität beeinflusst wird.

## **5. Materialien und Methoden**

### **5.1 Tiermodell**

Im Rahmen des Tierversuchsvorhabens Nummer 22-2684-04-02-050/13, sind alle in der Arbeit durchgeführten Versuche beantragt worden. Die Prüfung und Genehmigung erfolgte durch das Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz.

Die Etablierung der Versuche fand an Herzmuskelproben männlicher Sprague- Dawley Ratten (Charles River®, Crl: SD 400) statt. Für die Versuche im Rattenmodell der HCR und LCR wurden männliche Nachkommen definierter Zuchtpaare der 33. Generation verwendet (Britton und Koch 2001).

Die Tiere wurden bei 12/12h Tag-/Nachtrhythmus und einer konstanten Temperatur von 21°C gehalten. Die Versorgung mit Wasser und Futter erfolgte ad libitum.

### **5.2 Transversale Aortenkonstriktion (TAC) und Echokardiographie**

Die Durchführung einer transversalen Aortenkonstriktion (TAC) bedingt einen verstärkten Widerstand der Ausstrombahn des Herzens. Heranwachsende Tiere entwickeln in Folge dieser links-ventrikulären Drucküberlastung eine Herzhypertrophie, bis hin zu einer Herzinsuffizienz. Das Verfahren wurde von einer Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe bei drei Wochen alten HCR und LCR nach den Methoden von Litwin et al. (1995) und deAlmeida et al. (2010) durchgeführt.

Eine echokardiographische Kontrolle zur Einschätzung der Herzleistung erfolgte nach 20 Wochen Drucküberlastung durch eine Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe. Die Parameter zur Bestimmung der Ejektionsfraktion (EF), der systolischen und diastolischen Funktion wurden gemäß der Richtlinien von Sahn et al. (1978) und Buck et al. (2009) gemessen. Als Marker der systolischen Herzfunktion diente die fraktionierte Verkürzung (FS). Zur Einschätzung der diastolischen Funktion wurde das E/A- Verhältnis verwendet.

### **5.3 Probenaufarbeitung**

Die HCR und LCR wurden im Alter von 23 Wochen mit Thiopental narkotisiert und ihre Organe entnommen. Danach wurden diese in eiskaltem NaCl- Puffer gewaschen, gewogen und bei -80°C gelagert. Vorbereitend wurden die Proben unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert und wieder bei -80°C bis zur Messung gelagert. Die Aufarbeitung erfolgte nach Tweedie et al. (2011). 20- 50 mg des gemörserten Gewebes wurden mit 200- 500 µl Lyse- Puffer (100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

2 mM EDTA und 2 Tabletten Proteinase- Inhibitor, pH- Wert 7,4) versetzt und gemischt. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 3000\*g und 4°C für fünf Minuten. Ein Teil des Überstands wurde abgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für die Detektion der Katalase, sowie der SOD genutzt (Tweedie et al. 2011). Der restliche Überstand wurde erneut bei 10000\*g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert, abgenommen und für die Analyse der Glutathion Peroxidaseaktivität verwendet (Forstrom et al. 1978, Ursini et al. 1985). Sollten die Messungen nicht am gleichen Tag erfolgen, wurden die Proben bei -20°C gelagert.

#### 5.4 Katalaseaktivität

Die Detektion der Katalaseaktivität wurde nach dem Verfahren von Aebi (1984), sowie Weydert und Cullen (2010) in abgewandelter Form durchgeführt. Diese photometrische Messmethode beruht auf dem speziellen Absorptionsmuster von Wasserstoffperoxid bei einer Wellenlänge von 240 Nanometern. In diesem Bereich entspricht der Umsatz von einem  $\mu\text{Mol}$  Wasserstoffperoxid pro Minute einer Katalaseaktivität von einer Unit. Die zuvor aufgearbeiteten Proben wurden aufgetaut und durchmischt. Es erfolgte die Verdünnung mittels eines Phosphat- Puffers, welcher wie folgt hergestellt wurde. Nach der Erstellung von jeweils 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sowie 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  Stock- Lösungen, wurde der 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Stock so lange dem 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  Stock zugegeben, bis der pH-Wert bei 7,8 lag. Der Puffer ist, bei 4°C gelagert, ein Jahr stabil.

Als Substrat der Reaktion diente 30 mM Wasserstoffperoxid in Phosphat- Puffer. Zur Kontrolle der ablaufenden Reaktion wurde eine Positivkontrolle mittels *Catalase preparation Aspergillus niger* (Sigma C<sub>16</sub>K3789) hergestellt. Aus der Lösung wurde mittels des Phosphat- Puffers 1 ml einer 400 U/ml Stock- Lösung hergestellt und diese bei 4°C gelagert. Im Versuch wurden 5  $\mu\text{l}$  des Stocks verwendet.

Zur Messung wurden Mikrotiterplatten (MTP, Greiner bio-one, 655801) genutzt, welche eine Detektion der Absorption im UV- Bereich ermöglichen. Es wurde ein Messprotokoll für den Versuch am PC entworfen und am Photometer (*Biotek Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader*) eingestellt. Die Messung erfolgte als kinetische Methode über zwei Minuten in einem Messintervall von 15 Sekunden, bei einer Wellenlänge von 240 nm. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Schichtdicken der Lösungen ermittelt. Alle Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung.

Zu Beginn der Messung wurden 150  $\mu\text{l}$  des Phosphat- Puffers als Leerwert, sowie 5  $\mu\text{l}$  Probe und Positivkontrolle in jeweils drei Näpfchen der MTP pipettiert. Anschließend wurden die Probe und Kontrolle mit 45  $\mu\text{l}$  Phosphat- Puffer versetzt. Nach Abschluss der Vorbereitung wurden zügig, mittels einer Mehrkanalpipette, 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 mM) zugegeben und sofort mit der Messung

begonnen. Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach dem Lambert- Beer- Gesetz (Abb. 2) (Lambert 1760, Beer 1852) unter Einbeziehung des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  für Wasserstoffperoxid ( $43,6 \text{ (l*cm)*Mol}^{-1}$ ).

$$\text{Katalaseaktivität in Katal} = \frac{\Delta E * V}{t * \epsilon * d}$$

**Abb. 2: Formel zur Berechnung der Katalaseaktivität**  $\Delta E$ = Absorptionsänderung über die Zeit  $t$ ,  $V$ = Gesamtvolumen,  $t$ = Zeit,  $\epsilon$ = molarer Extinktionskoeffizient ( $43,6 \text{ (l*cm)*Mol}^{-1}$ ),  $d$ = Schichtdicke in cm

### 5.5 Superoxid Dismutaseaktivität (SOD)

Die Methode zur Detektion der Enzymaktivität beruht auf dem Verfahren nach Marklund und Marklund (1974). Diesem liegen die speziellen Eigenschaften des Farbstoffes Pyrogallol zugrunde. In alkalischer Lösung kommt es zu dessen Autooxidation und damit verbunden zur Entstehung von Chinonverbindungen, welche ein spezielles Absorptionsmuster bei 420 nm aufweisen (Ramasarma et al. 2015). Der pH- Bereich, in welchem die Reaktion stattfindet, liegt bei 7,9- 10,6 (Marklund und Marklund 1974). In Gegenwart der Superoxid Dismutase wird diese Reaktion gehemmt. Die Enzymaktivität verhält sich dabei proportional zur Hemmung der Autooxidation. Erfasst wurden sowohl die gesamte SOD- Aktivität, aber auch die Aktivitäten ihrer Isoformen, nämlich die der Mn- SOD, in den Mitochondrien lokalisiert, und der Cu- Zn- SOD, welche im Zytoplasma zu finden ist.

Die Herstellung des Pyrogallol- Gemischs (8 mM; Sigma P0381) erfolgte vor jeder Messung neu. Durch Zugabe 37%iger HCl- Lösung, bis zu einer Endkonzentration von 10 mM, wurde die Autooxidation von Pyrogallol, bis zum Zeitpunkt der Messung, verhindert. Um allein die mitochondriale SOD zu erfassen ist eine Inhibition des im Zytosol lokalisierten Enzyms notwendig. Dazu wurde  $0,1 \text{ }\mu\text{M}$  KCN (Sigma 31252) verwendet, welches die Cu- Zn- Isoform hemmt, jedoch die mitochondriale nicht beeinflusst (Flohe und Otting 1984). Der für die Berechnung notwendige 100%- Wert wurde ermittelt indem die Probe durch destilliertes Wasser ersetzt wurde.

Zuerst wurden  $10 \text{ }\mu\text{l}$  der unverdünnten Proben, beziehungsweise destilliertes Wasser, in Nöpfchen der MTP (Greiner bio-one, 655101) pipettiert und mit  $280 \text{ }\mu\text{l}$  Tris- HCl- Puffer (0,5 mM, pH 8,5) versetzt. Als Leerwert dienten  $300 \text{ }\mu\text{l}$  des Puffers. Nach zehnminütiger Inkubation bei  $24^\circ\text{C}$  wurden  $10 \text{ }\mu\text{l}$  Pyrogallol (8 mM) zugegeben, um die Reaktion zu starten. Die Detektion erfolgte über zwei Minuten in einem Intervall von 15 Sekunden, bei 420 nm. Um die Mn- Isoform zu erfassen,



wurden zusätzlich zu den 10 µl der unverdünnten Probe 10 µl KCN (0,1 µM), sowie 270 µl des Tris- HCl- Puffers gegeben. Die restliche Prozedur unterschied sich nicht.

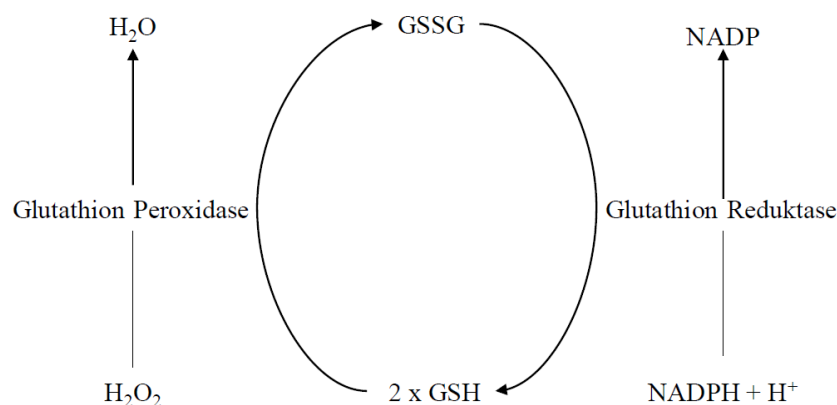
$$SOD \text{ Aktivität in } U = \frac{(\Delta E_{100\%} - \Delta E_{Probe}) * V_{gesamt}}{v_{Probe} * (\frac{\Delta E_{100\%}}{2})}$$

**Abb. 3: Formel zur Berechnung der SOD- Aktivität**  $\Delta E_{100\%}$  = Absorptionsänderung bei ungehemmter Autooxidation;  $\Delta E_{Probe}$  = Absorptionsänderung der Probe;  $V_{gesamt}$  = Gesamtvolumen der Reaktion;  $v_{Probe}$  = Probenvolumen

Die Berechnung der Aktivität erfolgte mittels der in Abb. 3 dargestellten Formel (Keller 2004). Eine Unit ist als die 50%ige Inhibition der Reaktion definiert. Um die Aktivität der Cu- Zn- SOD zu erfassen wurde die Differenz aus Gesamt SOD und Mn- SOD gebildet.

## 5.6 Glutathion Peroxidaseaktivität (GPx)

Grundlage für die Messung bildet der Kreislauf zur Regeneration des Antioxidans Glutathion. Dieses wird, wie in Abb. 4 dargestellt, über mehrere Einzelreaktionen verbraucht und in seiner reduzierten Form, mit freien Sulfidgruppen, wieder regeneriert. Paglia und Valentine (1967) erkannten, dass die Abnahme des Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH)- Spiegels mit der Aktivität der Glutathion Peroxidase korreliert. Da NADPH spektrophotometrisch bei 340 nm



**Abb. 4: Reaktionskreislauf zur Regeneration von zwei Glutathion Molekülen**

Die Aktivität der Glutathion Peroxidase korreliert mit dem Verbrauch von NADPH durch die Glutathion Reduktase. Glutathion (GSH), oxidiertes Glutathion (GSSG), oxidiertes Nicotin- Adenin- Dinucleotid (NADP), reduziertes Nicotin- Adenin- Dinucleotid (NADPH), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Wasserstoffion ( $H^+$ )

detektiert werden kann, erlaubt dies die Erfassung der Enzymaktivität. 1 Unit entspricht der Umwandlung von 1  $\mu\text{mol}$  NADPH zu NADP pro Minute bei 37 °C (Tappel 1978). Die Reaktion erfordert das Vorhandensein der anderen Substrate und Enzyme, welche an der Glutathion (GSH)-Regeneration beteiligt sind. Dazu wurde ein Puffer, bestehend aus GSH (9 mM; Sigma G4251), NADPH (0,2 mM; Sigma 93025) und Glutathion Reduktase (7,5 U/ml; Sigma Aldrich G3664) hergestellt. Gelöst wurden diese Stoffe in einem Puffer bestehend aus Tris- HCl (50 mM) und EDTA (0,1 mM) mit einem pH- Wert von 7,6. Als Substrat für die Glutathion Peroxidase diente *Cumene Hydroperoxid* (80%; Sigma Aldrich 247502), welches mit destilliertem Wasser zu einer 1,2 M Lösung vermischt wurde.

In die Nüpfchen der MTP (Greiner bio-one, 655101) wurden 15  $\mu\text{l}$  unverdünnte Probe pipettiert und anschließend mit 200  $\mu\text{l}$  GSH- Puffer versetzt. Als Leerwert fanden 225  $\mu\text{l}$  GSH- Puffer Verwendung. Danach wurde die Platte im Photometer für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu starten, wurden 10  $\mu\text{l}$  Cumene Hydroperoxide zügig pipettiert. Die Messung erfolgte über zwei Minuten in einem Messintervall von 15 Sekunden bei 340 nm. Anschließend wurden die Werte in eine Excel Tabelle übertragen und, ähnlich der Katalaseaktivität, nach dem Lambert-Beer- Gesetz (Lambert 1760, Beer 1852) berechnet. Es wurde der molare Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm mit 0,0062 ( $1 \cdot \text{cm}$ ) / $\mu\text{mol}$  verwendet.

### 5.7 Quantitative Proteinbestimmung

Für die quantitative Proteinbestimmung wurde die Methode nach Bradford (1976) verwendet. Das Verfahren beruht auf dem Farbumschlag eines Färbereagens, in Abhängigkeit der Proteinkonzentration einer Probe. Dieser Farbumschlag wird bei 595 nm detektiert.

Vor der Messung wurden die Proben aufgetaut und mit destilliertem Wasser in einem Verhältnis von 1:40 verdünnt. Das Photometer wurde gestartet und das für den Versuch erstellte Messprotokoll ausgewählt. Zur Detektion der Proteinmenge ist eine Standardgerade notwendig. Vorbereitend dafür wurde *Bovines Serum Albumin* (BSA, Sigma P0834) in den Konzentrationen 0,2; 0,4; 0,6 und 0,8 mg/ml erstellt. Das Färbereagenz (BioRad, 500- 0006) wurde im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und bis zur Messung bei Raumtemperatur gelagert. Als Leerwert, zur Subtraktion des Hintergrundes, wurde destilliertes Wasser verwendet.

Das Verfahren wird als Dreifachbestimmung in MTP (Greiner bio-one, 655101) durchgeführt. In alle zu messenden Reaktionsgefäße wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  destilliertes Wasser, Standard, beziehungsweise verdünnte Probe pipettiert. Direkt im Anschluss erfolgte die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Färbereagenz mittels einer Mehrkanalpipette. Die Platte wurde zur Inkubation in das Photometer

gestellt. Nach Drei Minuten begann die Messung. Die Berechnung der Konzentration erfolgte durch die Software des Photometers. Die Werte wurden in Excel übertragen und in mg/ ml angegeben.

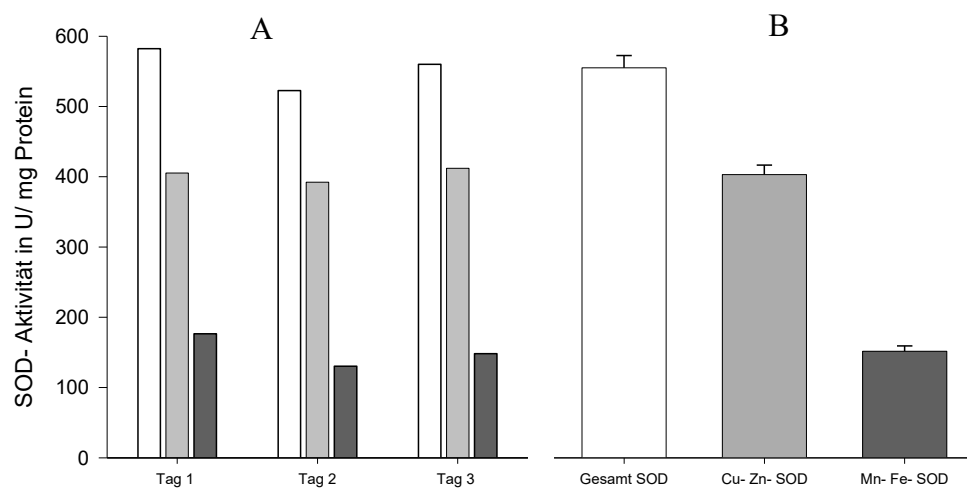
### 5.8 Statistische Analysen

Zur statistischen Analyse der Daten wurde die Software Sigma Plot verwendet. Die Mittelwerte der Daten wurden errechnet und die Abweichungen als Standardfehler angegeben. Für die statistische Analyse der HCR und LCR Werte wurde eine *Two way ANOVA* (HCR/LCR: Kontrolle/TAC, Kontrolle/Kontrolle, sowie TAC/TAC) durchgeführt, gefolgt von der Holm- Sidak- Methode. Statistische Ausreißer wurden durch den Ausreißertest nach Grubbs ermittelt. Die Signifikanzniveaus für Vergleiche innerhalb der Populationen wurden mit \* gekennzeichnet, die Vergleiche der Behandlungen mit #. Es erfolgte die Angabe durch  $P < 0,05 = */\#$ ,  $P < 0,01 = **/\##$ ,  $P < 0,001 = ***/###$ , sowie ns = nicht signifikant.

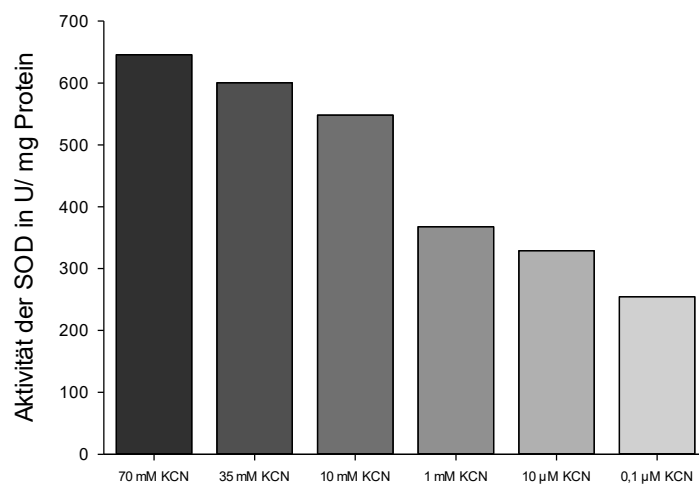
## 6. Ergebnisse

### 6.1 Etablierung der Verfahren zur Messung der Superoxid Dismutaseaktivität

Messungen der SOD Aktivität in Herzmuskelproben eines Tieres lieferten an verschiedenen Tagen ähnliche Ergebnisse (Abb. 5). Dies galt sowohl für die Gesamt SOD, als auch für die zytosolische und mitochondriale SOD. Die Auswirkungen unterschiedlicher KCN Konzentrationen auf die detektierte Aktivität der SOD sind in Abb. 6 dargestellt. Konzentrationen unter  $0,1 \mu\text{M}$  KCN beeinflussten die Aktivität nicht weiter.

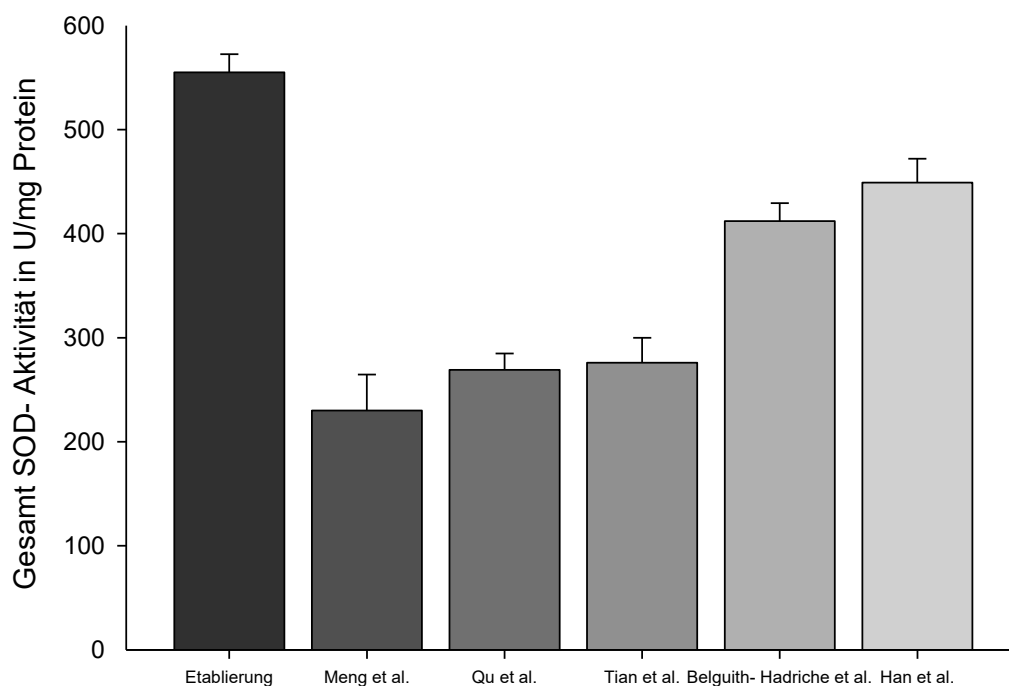


**Abb. 5: SOD- Aktivitäten in Herzproben des gleichen Tieres** Angegeben sind die gemessenen Werte an verschiedenen Tagen (A), sowie deren Mittelwerte mit deren Standardfehler (B).



**Abb. 6: Auswirkungen unterschiedlicher Kalium Cyanid (KCN) Konzentrationen auf die Aktivität der SOD**

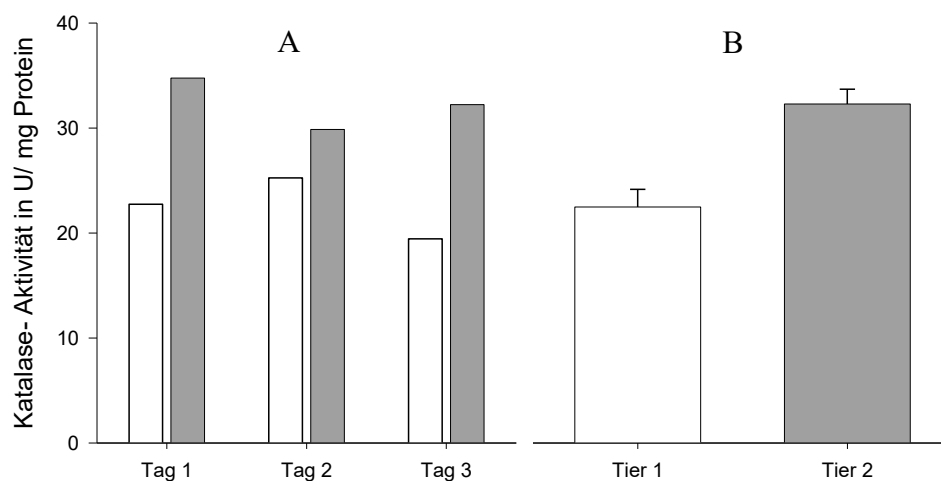
Die während der Etablierung detektierten Aktivitäten in Herzmuskelproben wurden mit den Ergebnissen aus anderen Arbeiten verglichen (Han et al. 2014, Meng et al. 2016, Qu et al. 2016, Tian et al. 2016, Belguith-Hadriche et al. 2016). Es wurde darauf geachtet, dass die Aktivitäten ebenfalls in Sprague Dawley Tieren, sowie an Herzmuskelproben von Kontrolltieren detektiert wurden. Die Verfahren zur Bestimmung unterschieden sich, wobei die Aktivität der SOD in Units immer gleich definiert war. Die Ergebnisse des Vergleichs sind in Abb. 7 dargestellt. Damit der Vergleich möglich war, wurde darauf geachtet, nur Arbeiten auszuwählen, welche die Aktivität in U/ mg Protein angaben. Die gemessene Aktivität der SOD in Herzmuskelproben war höher als in den zum Vergleich verwendeten Arbeiten.



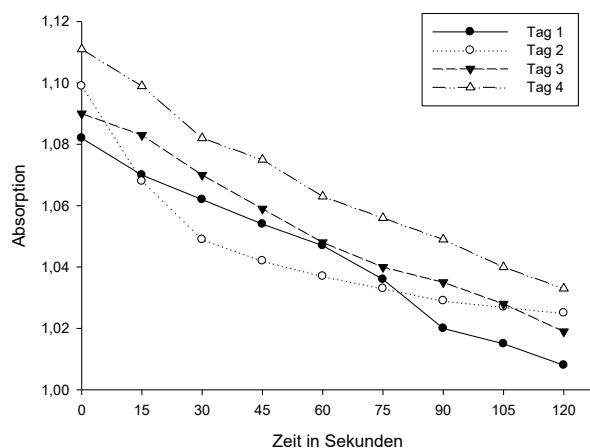
**Abb. 7: Gesamt- SOD- Aktivität im Herzmuskelgewebe von Sprague Dawley Ratten im Literaturvergleich** (Han et al. 2014, Meng et al. 2016, Qu et al. 2016, Tian et al. 2016, Belguith-Hadriche et al. 2016).

## 6.2 Etablierung der Verfahren zur Messung der Katalaseaktivität

Um zu untersuchen, ob Unterschiede zwischen den Aktivitäten einzelner Proben messbar sind, wurden Herzproben von zwei verschiedenen Tieren an unterschiedlichen Tagen untersucht. Es zeigte sich, dass die Aktivitäten leichten Schwankungen unterlagen, jedoch der Unterschied über die einzelnen Tage erhalten blieb (Abb. 8). Die Proben von Tier 2 zeigten eine höhere Katalaseaktivität als die von Tier 1. Um zu detektieren, ob die Reaktion abläuft, wurde eine Positivkontrolle etabliert. Die Werte und Kurvenverläufe der Positivkontrolle an verschiedenen Tagen sind in Abb. 9 sowie Tabelle 1 dargestellt.



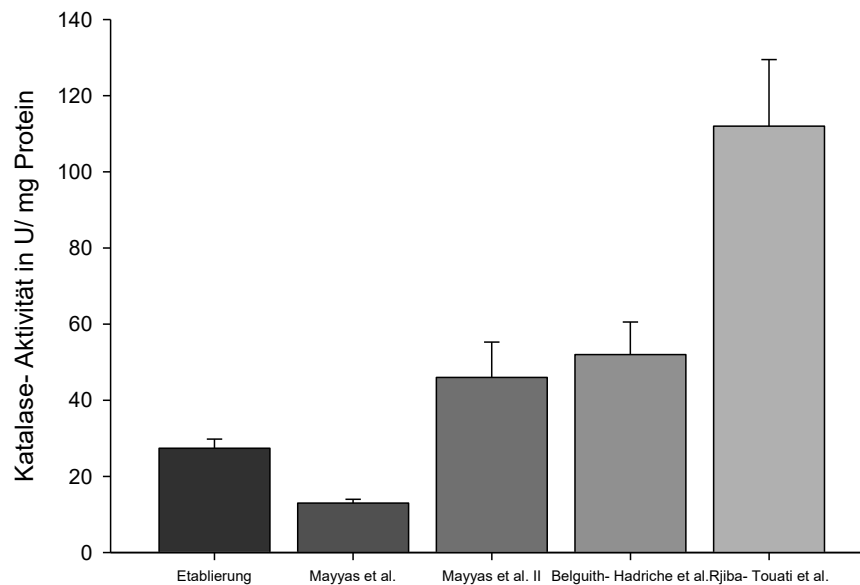
**Abb. 8: Katalaseaktivität verschiedener Herzproben** Angegeben sind die gemessenen Werte an verschiedenen Tagen (A), sowie deren Mittelwerte mit deren Standardfehler (B). Sprague Dawley Tier 1 (weiß), Sprague Dawley Tier 2 (grau).



**Tabelle 1** Absorptionsänderung ( $\Delta I$ ) der Positivkontrolle an verschiedenen Tagen

TAG	$\Delta I$
EINS	0,0740
ZWEI	0,0740
DREI	0,0710
VIER	0,0780

**Abb. 9: Kurvenverläufe der Absorption der Positivkontrolle** Dargestellt sind wiederholte Messungen an verschiedenen Tagen.

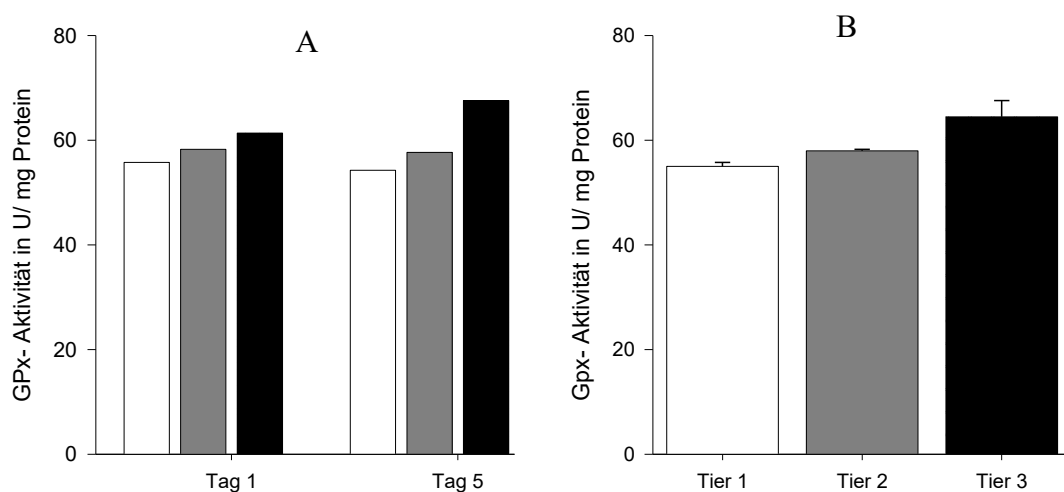


**Abb. 10: Katalaseaktivität im Herzmuskelgewebe von Sprague Dawley Ratten im Literaturvergleich** (Belguith-Hadriche et al. 2016, Rjiba-Touati et al. 2016, Mayyas et al. 2017b, Mayyas et al. 2017a).

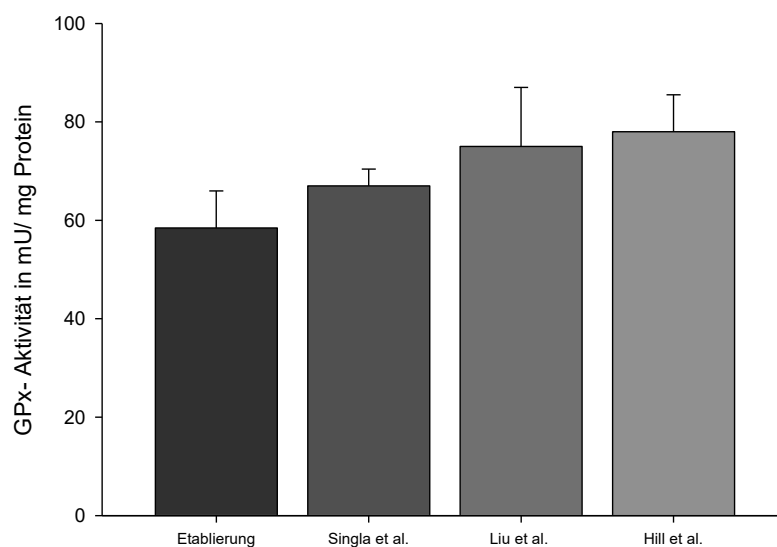
Die gemessenen Katalaseaktivitäten der Tiere wurden mit Werten aus anderen Arbeiten verglichen (Belguith-Hadriche et al. 2016, Rjiba-Touati et al. 2016, Mayyas et al. 2017b, Mayyas et al. 2017a). Wichtig war, dass die Messungen ebenfalls an Herzmuskelpollen, sowie in Sprague Dawley Ratten durchgeführt wurden. Die Vergleichstiere entstammten immer den Kontrollgruppen. Die Verfahren zur Aktivitätsbestimmung unterschieden sich teilweise. Die Definition einer Unit der Katalase- Aktivität war jedoch identisch. Damit ein Vergleich möglich war, wurden nur Werte in U/ mg Protein gewählt. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 aufgeführt. Die Aktivität, welche während der Etablierung detektiert wurde, lag im unteren Bereich zwischen den Werten der anderen Arbeiten.

### 6.3 Etablierung der Verfahren zur Messung der Glutathion Peroxidaseaktivität

Messungen unterschiedlicher Proben an verschiedenen Tagen wurden im Zuge der Etablierung ebenfalls für die Glutathion Peroxidase durchgeführt. Es zeigte sich, dass die gemessenen Werte in ähnlichen Bereichen lagen und ebenfalls Unterschiede zu verzeichnen waren (Abb. 11). Die gemessenen Glutathion Peroxidaseaktivitäten wurden mit Werten aus anderen Arbeiten verglichen. Dieser Vergleich ist in Abb. 12 dargestellt (Hill und Singal 1996, Singla et al. 2007, Liu et al. 2013). Verwendung fanden nur Arbeiten, welche ebenfalls Messungen an Herzmuskelproben von Sprague Dawley Tieren durchführten.



**Abb. 11: Glutathion Peroxidaseaktivität verschiedener Herzproben** Angegeben sind die gemessenen Werte an verschiedenen Tagen (A), sowie deren Mittelwerte mit deren Standardfehler (B). Sprague Dawley Tier 1 (weiß), Sprague Dawley Tier 2 (grau) und Sprague Dawley Tier 3 (schwarz).

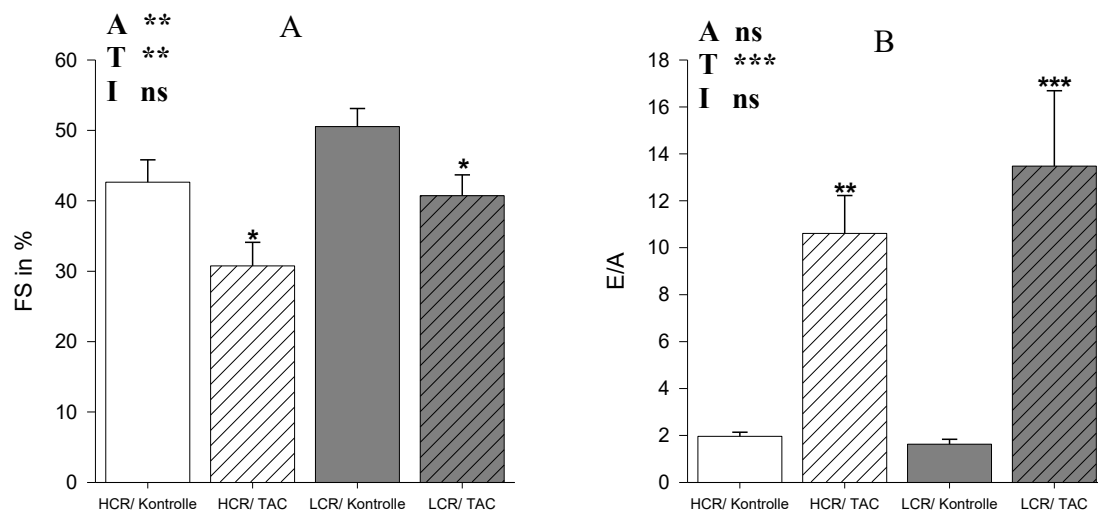


**Abb. 12: Glutathion Peroxidaseaktivität im Herzmuskelgewebe von Sprague Dawley Ratten im Literaturvergleich** (Hill und Singal 1996, Singla et al. 2007, Liu et al. 2013).



Es wurde darauf geachtet, nur die Werte der Kontrolltiere zu verwenden. Obwohl sich die Verfahren zur Aktivitätsbestimmung teilweise unterschieden, war eine Unit der Glutathion Peroxidase-aktivität immer gleich definiert. Es wurden nur Arbeiten gewählt, in welchen die Aktivität im Verhältnis zur Proteinkonzentration (U/ mg Protein) angegeben wurde. Die gemessene Aktivität der Glutathion Peroxidase war geringer als die Vergleichswerte.

#### 6.4 Ventrikelfunktion von HCR und LCR vor und nach Drucküberlastung



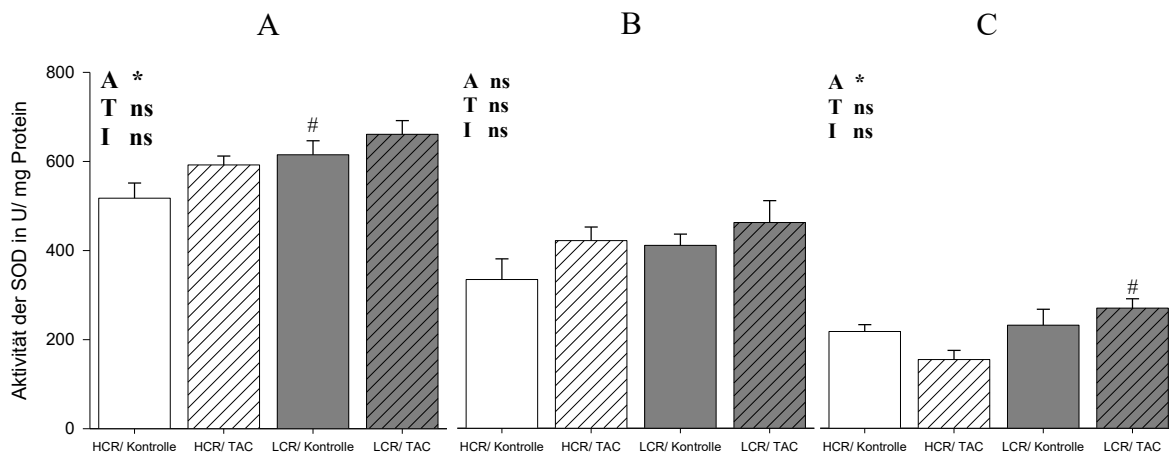
**Abb. 13: Werte der Echokardiographie von HCR und LCR vor und nach Drucküberlastung**

Verkürzungsfraction (A, FS), sowie das E/A- Verhältnis (B) als Marker der systolischen (FS) und diastolischen (E/A) Funktion der Herzmuskel 20 Wochen nach TAC. Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardfehler (n=8). A= Ausdauerkapazität, T= TAC, I= Interaktionen.

Die Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchung der Tiere nach 20 Wochen Drucküberlastung sind in Abb. 13 dargestellt. Aufgeführt sind die Verkürzungsfraction (FS, Abb. 13 A), als Marker der systolischen Herzfunktion, sowie das E/A- Verhältnis (B), welche die diastolische Funktion widerspiegelt. Die FS wird durch die Drucküberlastung in HCR und LCR vermindert. Die Herzinsuffizienz führt zu einem gesteigerten E/A- Verhältnis in beiden Populationen. Die LCR weisen eine größere diastolische Dysfunktion als die HCR auf.

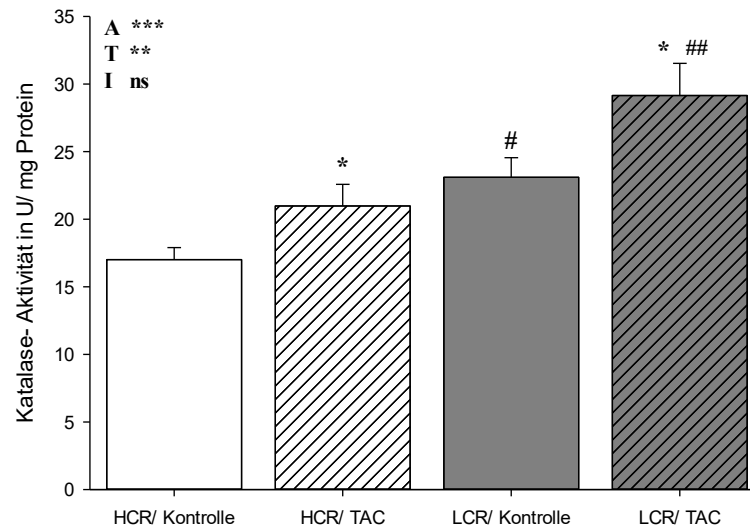
### 6.5 Antioxidative Enzymaktivitäten in HCR und LCR vor und nach Drucküberlastung

Die Gesamt SOD- Aktivität (Abb. 14 A) der LCR war höher als die der HCR. Die Unterschiede der Aktivitäten zwischen HCR und LCR waren für die Cu- Zn- SOD ähnlich, aber nicht signifikant (B). Die Aktivitäten der mitochondrialen SOD (C) waren in HCR geringer als in LCR. Eine Drucküberlastung führte sowohl bei HCR, als auch bei LCR zu einer gesteigerten Enzymaktivität der Gesamt- SOD, sowie der Cu- Zn- SOD. Die Herzinsuffizienz bedingte eine geringere mitochondriale SOD Aktivität in HCR, aber eine gesteigerte in LCR.



**Abb. 14: Aktivitäten der Superoxid Dismutase in HCR und LCR vor und nach Drucküberlastung (TAC)**

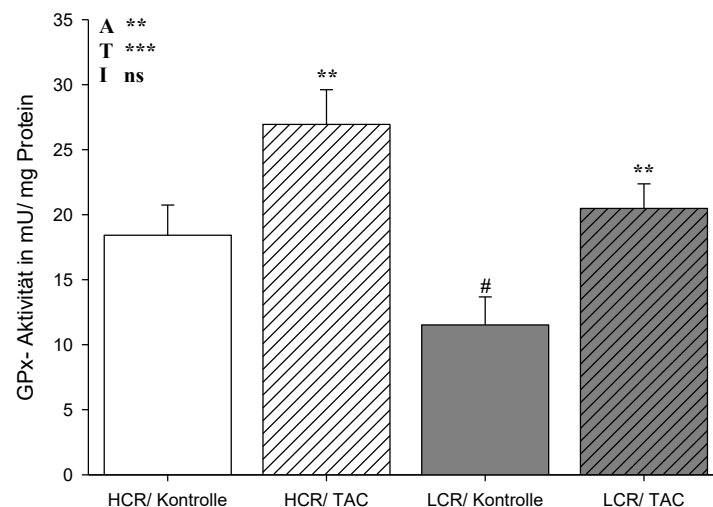
Die Aktivitäten in HCR/ Kontrolle, HCR/ TAC, LCR/ Kontrolle und LCR/ TAC sind für die Gesamt SOD (A), Cu- SOD (B) und Mn- SOD (C) angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler (n=8). A= Ausdauerkapazität, T= TAC, I= Interaktionen. Die Vergleiche innerhalb der Populationen sind mit \* gekennzeichnet, die Vergleiche der Behandlungen mit #.  $P < 0,05 = */\#$ ,  $P < 0,01 = **/\#\#$ ,  $P < 0,001 = ***/\#\#\#$ , ns = nicht signifikant.



**Abb. 15: Aktivitäten der Katalase in HCR und LCR vor und nach Drucküberlastung (TAC)**

Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler (n=8). A= Ausdauerkapazität, T= TAC, I= Interaktionen. Die Vergleiche innerhalb der Populationen sind mit \* gekennzeichnet, die Vergleiche der Behandlungen mit #.  $P<0,05 = */\#$ ,  $P<0,01 = **/\##$ ,  $P<0,001 = ***/\###$ , ns = nicht signifikant.

Die Katalaseaktivitäten der unterschiedlichen Gruppen sind in Abb. 15 dargestellt. Die LCR zeigten ebenfalls eine höhere Katalaseaktivität als die HCR. Die Herzinsuffizienz steigert sowohl in HCR als auch in LCR die Enzymaktivität. LCR zeigten eine größere Erhöhung als HCR. Die Glutathion Peroxidaseaktivität der HCR war höher als die der LCR (Abb. 16). Betrachtet man die Aktivitäten der herzinsuffizienten Tiere, so zeigt sich eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität sowohl bei HCR als auch bei LCR.



**Abb. 16: Aktivitäten der Glutathion Peroxidase in HCR und LCR vor und nach Drucküberlastung (TAC)**

Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler (n=8). A= Ausdauerkapazität, T= TAC, I= Interaktionen. Die Vergleiche innerhalb der Populationen sind mit \* gekennzeichnet, die Vergleiche der Behandlungen mit #.  $P<0,05 = */\#$ ,  $P<0,01 = **/\##$ ,  $P<0,001 = ***/\###$ , ns = nicht signifikant.

## 7. Diskussion

Tiere mit hoher intrinsischen körperlichen Leistungsfähigkeit (HCR) haben eine geringere SOD- und Katalaseaktivität als Tiere mit einer niedrigen intrinsischen körperlichen Leistungsfähigkeit (LCR). Die Aktivität der Glutathion Peroxidase ist dagegen in HCR höher als in LCR. Eine durch Drucküberlastung ausgelöste Herzinsuffizienz führt unabhängig von der Leistungsfähigkeit der Tiere zu einer gesteigerten Aktivität aller Enzyme im Herzmuskelgewebe.

Die Etablierung der einzelnen Verfahren orientierte sich an anderen Arbeiten. Diese wurden modifiziert und angepasst. Zur Detektion der SOD- Aktivität wurde ein Tris- HCl Puffer mit einem pH- Wert von 8,5 verwendet, da nach Marklund und Marklund (1974) das pH- Optimum bei 7,9–9,1 liegt. Wird dieser Wert überschritten, nimmt die Sensitivität mit steigendem pH ab. Da bei der empfohlenen Pyrogallolkonzentration von 0,2 mM keine Detektion möglich war, wurde sie auf 8 mM erhöht (Marklund und Marklund 1974, Ramasarma et al. 2015). Die von Marklund und Marklund (1974) empfohlene Temperatur von 25 °C sowie die Wellenlänge von 420 nm wurden beibehalten. Andere Antioxidantien, wie Katalase oder Glutathion, beeinflussen die Detektion mittels Pyrogallol nicht, womit die Messwerte ausschließlich auf die Aktivität der SOD zurückzuführen sind (Marklund und Marklund 1974, Roth und Gilbert 1984). Cyanide hemmen die Autooxidation von Pyrogallol gleichermaßen wie die SOD. Die Konzentration von 1 mM KCN beeinflusste die Reaktion so stark, dass keine Detektion der Mn- Fe- SOD möglich war. Nachdem die Konzentration auf 0,1 µM KCN gesenkt wurde, war eine Messung möglich. Messungen von Proben des gleichen Tiers an verschiedenen Tagen zeigten, dass die Ergebnisse reproduzierbar sind. Zur Validierung erfolgte ein Vergleich mit den Gesamt- SOD- Aktivitäten von Herzmuskelproben aus anderen Arbeiten. Insgesamt war die gemessene Aktivität bei dem hier verwendeten Verfahren geringfügig höher, aber in der gleichen Größenordnung. Die Methoden waren immer kinetische Messverfahren, welche die Enzymaktivität über eine Hemmung oxidativer Farbstoffentstehung erfassen. Eine Unit war gleichermaßen als die 50%ige Inhibition der Farbstoffentstehung definiert. Meng et al. (2016), Qu et al. (2016), Tian et al. (2016) und Han et al. (2014) verwendeten vorgefertigte Bausätze, welche von Firmen bezogen wurden. Als Farbstoff dient dabei Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT), welches durch von der Xanthin Oxidase generierte Radikale oxidiert wird. Weiterhin war die Zugabe einer Katalaselösung notwendig, da das entstandene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Reaktion beeinflusst. Die von Belguith-Hadriche et al. (2016) verwendete Methode nutzte als Radikalquelle Riboflavin, welches unter UV- Licht instabil wird, sowie ebenfalls NBT als Farbstoff (Belguith-Hadriche et al. 2013). Bis auf in der Arbeit von Meng et al. (2016) wurden die Messungen ebenfalls

an zuvor eingefrorenen Proben durchgeführt. Die in dieser Arbeit etablierte Methode stellt eine valide Alternative zu den verglichenen Verfahren dar. Des Weiteren ist sie deutlich kostengünstiger, da keine weiteren Enzyme als Radikalquelle oder zur Elimination von  $\text{H}_2\text{O}_2$  benötigt werden. Durch eine geringere Anzahl an Reagenzien, sowie die Eigenschaften von Pyrogallol zeichnet sich das Verfahren weiterhin durch eine geringere Anzahl möglicher Störquellen aus.

Die Messung der Katalaseaktivität orientierte sich an den von Aebi (1984) sowie Weydert und Cullen (2010) entwickelten Varianten. Die empfohlenen pH- Werte schwanken zwischen 6,8- 8,0 (Nelson und Kiesow 1972, Aebi 1984, Weydert und Cullen 2010). Obwohl 7,0 (Aebi 1984) als optimaler Wert angegeben ist, wurde sich für einen pH von 7,8 entschieden, da dieser für die Aktivitätsmessung in allen Geweben geeignet sein soll (Weydert und Cullen 2010). Entscheidend für die Detektion ist die optimale Wasserstoffperoxidkonzentration. Ist diese zu gering, findet keine Reaktion statt. Übersteigt sie 50 mM, kommt es zu einer Verfälschung durch zu starke Blasenbildung und ab 100 mM zu einer Inaktivierung des Enzyms (Bonnichsen 1947, Aebi 1984). Als optimal wird eine Konzentration im Bereich von 10- 50 mM genannt, weshalb eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von 30 mM eingesetzt wurde. Eine andere Variante beschrieb, dass die optimale Konzentration dann erreicht ist, wenn die Absorption des Reagenzes bei 240 nm in einem Bereich von 1,150- 1,200 liegt (Weydert und Cullen 2010). Diese Methode wurde getestet und stellte sich als funktionsfähig heraus. Da diese Variante zur Einstellung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ - Konzentration Schwankungen unterliegt und damit für verschiedene Messungen nicht die gleichen Bedingungen vorliegen, fiel die Wahl auf eine Konzentration von 30 mM. Messungen von verschiedenen Herzproben an verschiedenen Tagen konnten zeigen, dass die Ergebnisse reproduzierbar sind und Unterschiede zwischen verschiedenen Tieren aufzeigen können. Zur Validierung erfolgte ebenfalls der Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten. Die Detektion der Katalaseaktivität über die Elimination von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist ein geläufiges und gut reproduzierbares Verfahren. Belguith-Hadriche et al. (2016) und Rjiba-Touati et al. (2016) verwendeten die gleiche Methode wie in der vorliegenden Arbeit, führten die Messungen allerdings in Küvetten durch. Die Arbeiten von Mayyas et al. (2017b), Mayyas et al. (2017a) verwendeten eine andere komplexere Methode, welche Formaldehyd zur Detektion der Aktivität nutzt. Bis auf in der Arbeit von Rjiba-Touati et al. (2016) wurden für die Messungen immer zuvor gefrorene Herzproben verwendet. Das verwendete Verfahren ist einfach durchführbar und kostengünstig, da allein  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Substrat benötigt wird. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werte sind also reproduzierbar und liegen im Bereich der Katalaseaktivitäten anderer Arbeiten.

Das etablierte Verfahren zur Messung der Glutathion Peroxidaseaktivität orientierte sich an der Variante von Tappel (1978). Es wurde eine andere Methode zur Aufarbeitung der Proben verwendet, da die von Tappel (1978) empfohlene Variante sich auf Homogenate aus Lebergewebe bezog. Als pH- Wert für die Messung wurde der empfohlene von 7,6 verwendet. Die optimale Temperatur der Reaktion liegt in einem Bereich von 22- 37°C (Lawrence und Burk 1976, Tappel 1978, Cichoski A. J. 2012). Da sich die etablierte Methode an der Variante von Tappel (1978) orientierte, wurde die empfohlene Temperatur von 37 °C verwendet. Von entscheidender Bedeutung für das Ablaufen der NADPH- Umwandlung zur Detektion der Glutathion Peroxidaseaktivität, ist eine ausreichende Menge der verschiedenen Substrate und Enzyme des Reaktionskreislaufs. Zu Beginn der Etablierung wurde ein Puffer mit 0,12 mM NADPH, 0,25 mM GSH und Glutathion Reduktase mit einer Aktivität von 1 U/ml verwendet (Tappel 1978). Als keine Reaktion erfolgte und verschiedene Störfaktoren ausgeschlossen werden konnten, erfolgte eine Erhöhung auf 0,2 mM NADPH, 9 mM GSH, sowie der Glutathion Reduktaseaktivität auf 7,5 U/ ml. In Folge dessen war eine Reaktion nachweisbar. Als Substrat für die Reaktion wurden Wasserstoffperoxid und Cumene Hydroperoxide in verschiedenen Konzentrationen empfohlen (Paglia und Valentine 1967, Lawrence und Burk 1976, Tappel 1978). Cumene Hydroperoxide bedingt neben einer oxidativen Schädigung von Zellbestandteilen eine Lipidperoxidation, weshalb es von mehreren Isoformen der Glutathion Peroxidase umgesetzt wird (Weiss und Estabrook 1986). Deshalb wurde sich bei der Etablierung für Cumene als einziges Substrat entschieden. Zu Beginn wurde Cumene Hydroperoxide in einer Konzentration von 1 mg/ ml (5,4 mM) verwendet, wobei jedoch keine Reaktion stattfand (Tappel 1978). Die Konzentration wurde auf 1,2 M erhöht und der Versuch erfolgreich wiederholt. Messungen von mehreren Herzproben an verschiedenen Tagen konnten zeigen, dass die Ergebnisse reproduzierbar waren. Zum Abschluss der Etablierung erfolgte der Vergleich der gemessenen Aktivitäten mit anderen Arbeiten. Die Bestimmung der Enzymaktivität über die NADPH- Abnahme ist das geläufigste Verfahren und wurde in allen Arbeiten verwendet. Unterschiede bestanden in den Substraten und der praktischen Durchführung. Hill und Singal (1996), sowie Singla et al. (2007) verwendeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und führten die Methoden in Küvetten durch. Die restliche Prozedur ähnelte der in dieser Arbeit verwendeten. Liu et al. (2013) verwendeten tert-Butylhydroperoxid sowie einen vorgefertigten Bausatz zur Messung frischer Herzmuskelproben. In den übrigen Arbeiten wurden gefrorene Herzmuskelproben verwendet. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode lieferte ähnliche Ergebnisse wie die Methoden anderer Arbeiten. Somit war die Etablierung erfolgreich.

Eine hohe intrinsische körperliche Leistungsfähigkeit führt einerseits zu einer verminderten SOD- und Katalaseaktivität, aber auch zu einer höheren Glutathion Peroxidaseaktivität im

Herzmuskelgewebe im Vergleich zu Tieren mit niedriger intrinsischer körperlicher Leistungsfähigkeit. Die Glutathion Peroxidase ist durch ihre Beteiligung am Glutathion- Zyklus eng mit dem nicht- enzymatischen antioxidativen Schutzsystem verknüpft, welche eine wichtige Rolle bei der Adaptation an veränderte körperliche Leistungsfähigkeit spielen soll (Elokda und Nielsen 2007). Eine Steigerung der körperlichen Leistungsfähigkeit kann in Muskelgeweben zu kurzen Ischämiephasen mit Reperfusion führen (Saotome et al. 2009). In Folge dessen kommt es zu einer veränderten antioxidativen Antwort (Muthusamy et al. 2012). Eine milde Erhöhung des oxidativen Stresses in Muskelgeweben wurde sowohl bei Veränderungen der körperlichen Leistungsfähigkeit als auch bei HCR detektiert (Bye et al. 2008, Hartwig et al. 2009, Van Raamsdonk und Hekimi 2009, Tweedie et al. 2011). Im Skelettmuskelgewebe von HCR und LCR sind sowohl die SOD, als auch die Katalase in HCR aktiver (Tweedie et al. 2011). Weiterhin waren die Skelettmuskelzellen der HCR größerem oxidativem Stress ausgesetzt als die LCR. Die Unterschiede zu der hier vorliegenden Arbeit lassen sich durch die unterschiedlichen Gewebearten erklären. Im Herzmuskelgewebe führt ein Intervalltraining von zehn Wochen zu einer geringeren SOD- sowie Katalaseaktivität von trainierten Tiere (Schaun et al. 2017). Die intrazelluläre Glutathion Konzentration war im Gegensatz dazu in den trainierten Tieren deutlich höher. Sechs wöchiges Schwimmtraining führt zu keiner Veränderung von SOD- Aktivität und -Expression, erhöht allerdings die Katalaseaktivität (Pinho et al. 2012). Im Kontext der vorliegenden Ergebnisse betrachtet, führte ein Intervalltraining zu vergleichbaren Veränderungen der antioxidativen Enzyme wie eine gesteigerte intrinsische körperliche Leistungsfähigkeit.

Die Drucküberlastung führte sowohl bei HCR als auch LCR zu gesteigerten Aktivitäten der antioxidativen Enzyme. In einer Herzinsuffizienz kommt es zu einem vermehrten oxidativen Stress im Herzmuskelgewebe, wobei dieser mit der Dysfunktion des linken Ventrikels korreliert (Belch et al. 1991, Maack et al. 2003, Mollnau et al. 2005). Ratten, welchen medikamentös eine Herzinsuffizienz induziert wurde, zeigten eine größere ROS Produktion sowie Lipidperoxidation im Myokard (An et al. 2015). Stärkerer oxidativer Stress führt über die Veränderung der NF-  $\kappa$ B und MAPK- Signalwege zu einer gesteigerten Expression der enzymatischen antioxidativen Enzyme (Ji et al. 2006, Choi et al. 2015). Durch Verbesserung der Herzleistung zeigte sich eine Senkung der SOD- und Katalaseaktivität (Matysiak et al. 2014, Schaun et al. 2017). Die Veränderungen der Antioxidantien durch eine Drucküberlastung lassen sich auf vermehrten oxidativen Stress, welcher im Rahmen einer Herzinsuffizienz sowie verminderter Herzleistung entsteht, zurückführen.

## 8. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurden Verfahren zur Detektion der Aktivitäten der Superoxid Dismutase, Katalase und Glutathion Peroxidase etabliert. Die Messungen zeigten reproduzierbare Ergebnisse und lieferten mit anderen Arbeiten vergleichbare Werte. Tiere mit einer hohen intrinsischen körperlichen Leistungsfähigkeit (HCR) haben eine geringere SOD- und Katalaseaktivität als Tiere mit einer niedrigen intrinsischen körperlichen Leistungsfähigkeit (LCR). Die Aktivität der Glutathion Peroxidase ist dagegen in HCR höher als in LCR. Eine höhere intrinsische körperliche Leistungsfähigkeit hatte auf die antioxidativen Enzyme im Herzmuskelgewebe den gleichen Effekt wie ein aerobes Intervalltraining. Eine Herzinsuffizienz ist mit vermehrten oxidativen Stress assoziiert und führt zu einer gesteigerten Aktivität der antioxidativen Enzyme im Herzmuskelgewebe. Die Steigerung der Enzymaktivitäten, in einer Herzinsuffizienz, wird nicht von der intrinsischen körperlichen Leistungsfähigkeit beeinflusst.

Diese Ergebnisse liefern die Grundlage für weitere Überlegungen. Interessant wäre die Betrachtung der ROS Bildung sowie von ROS Schäden im Kontext der antioxidativen Enzymaktivität des Herzmuskelgewebes. Des Weiteren können die photometrischen Messverfahren genutzt werden, um die antioxidativen Enzymaktivitäten in anderen Krankheitsbildern und Tiermodellen zu untersuchen.



## 9. Literatur und Quellenverzeichnis

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105:121-126.

Alfadda AA, Sallam RM. 2012. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol*, 2012:936486.

An LP, An SK, Wei XH, Fu SY, Wu HA. 2015. Atorvastatin improves cardiac function of rats with chronic cardiac failure via inhibiting Rac1/P47phox/P67phox-mediated ROS release. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19 (20):3940-3946.

Baek IJ, Seo DS, Yon JM, Lee SR, Jin Y, Nahm SS, Jeong JH, Choo YK, Kang JK, Lee BJ, Yun YW, Nam SY. 2007. Tissue expression and cellular localization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in male mice. *J Mol Histol*, 38 (3):237-244.

Beer A. 1852. Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Annalen der Physik und Chemie*, 86:78-88.

Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M. 1991. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J*, 65 (5):245-248.

Belguith-Hadriche O, Bouaziz M, Jamoussi K, Simmonds MS, El Feki A, Makni-Ayedi F. 2013. Comparative study on hypocholesterolemic and antioxidant activities of various extracts of fenugreek seeds. *Food Chem*, 138 (2-3):1448-1453.

Belguith-Hadriche O, Ammar S, Contreras Mdel M, Turki M, Segura-Carretero A, El Feki A, Makni-Ayedi F, Bouaziz M. 2016. Antihyperlipidemic and Antioxidant Activities of Edible Tunisian *Ficus carica* L. Fruits in High Fat Diet-Induced Hyperlipidemic Rats. *Plant Foods Hum Nutr*, 71 (2):183-189.

Belmonte F, Das S, Sysa-Shah P, Sivakumaran V, Stanley B, Guo X, Paolocci N, Aon MA, Nagane M, Kuppasamy P, Steenbergen C, Gabrielson K. 2015. ErbB2 overexpression upregulates antioxidant enzymes, reduces basal levels of reactive oxygen species, and protects against doxorubicin cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 309 (8):H1271-1280.

Bonnichsen RK. 1947. A comparative study of the blood and liver catalases from the horse. *Arch Biochem*, 12 (1):83-94.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.

Brigelius-Flohe R. 2006. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem*, 387 (10-11):1329-1335.

Brigelius-Flohe R. 2013. Introduction to serial reviews on selenium and diabetes type 2--an unexpected link. *Free Radic Biol Med*, 65:1536-1537.

Britton SL, Koch LG. 2001. Animal genetic models for complex traits of physical capacity. *Exerc Sport Sci Rev*, 29 (1):7-14.

Buck T, Breithardt O-A, Faber L, Fehske W, Flachskampf FA, Franke A, Hagendorff A, Hoffmann R, Kruck I, Kücherer H, Menzel T, Pethig K, Tiemann K, Voigt J-U, Weidemann F, Nixdorff U. 2009. Manual zur Indikation und Durchführung der Echokardiographie. *Clinical Research in Cardiology Supplements*, 4 (1):3-51.

Bye A, Hoydal MA, Catalucci D, Langaas M, Kemi OJ, Beisvag V, Koch LG, Britton SL, Ellingsen O, Wisloff U. 2008. Gene expression profiling of skeletal muscle in exercise-trained and sedentary rats with inborn high and low VO<sub>2</sub>max. *Physiol Genomics*, 35 (3):213-221.

Chance B, Sies H, Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59 (3):527-605.

Chang YC, Segal BH, Holland SM, Miller GF, Kwon-Chung KJ. 1998. Virulence of catalase-deficient *aspergillus nidulans* in p47(phox)<sup>-/-</sup> mice. Implications for fungal pathogenicity and host defense in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*, 101 (9):1843-1850.

Choi SJ, Paek HJ, Yu J. 2015. Oxidative stress by layered double hydroxide nanoparticles via an SFK-JNK and p38-NF-kappaB signaling pathway mediates induction of interleukin-6 and interleukin-8 in human lung epithelial cells. *Int J Nanomedicine*, 10:3217-3229.

Chow CK. 1988. Interrelationships of cellular antioxidant defense system, In: *Cellular Antioxidant Defense Mechanisms*. CRC Press:217- 238.

Cichoski A. J. RRB. 2012. Investigation of glutathione peroxidase activity in chicken meat under different experimental conditions. *Ciencia e Technologica de Alimentos*, 32(4):661-667.

Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. 1987. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*, 107 (4):526-545.

deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XH. 2010. Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp*, (38).

Ding L, Liu Z, Zhu Z, Luo G, Zhao D, Ni J. 1998. Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic. *Biochem J*, 332 ( Pt 1):251-255.

Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82 (1):47-95.

- Elokda AS, Nielsen DH. 2007. Effects of exercise training on the glutathione antioxidant system. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 14 (5):630-637.
- Flohe L, Otting F. 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol*, 105:93-104.
- Flohe L, B-FR, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, and Ursini F. 2001. Selenium and male reproduction. In “Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health” (D L Hatfield, Ed):Chap 22, pp. 273–281.
- Forstrom JW, Zakowski JJ, Tappel AL. 1978. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry*, 17 (13):2639-2644.
- Frampton J, Conkie D, Chambers I, McBain W, Dexter M, Harrison P. 1987. Changes in minor transcripts from the alpha 1 and beta maj globin and glutathione peroxidase genes during erythropoiesis. *Nucleic Acids Res*, 15 (9):3671-3688.
- Fridovich I. 1975. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 44:147-159.
- Furuta A, Price DL, Pardo CA, Troncoso JC, Xu ZS, Taniguchi N, Martin LJ. 1995. Localization of superoxide dismutases in Alzheimer's disease and Down's syndrome neocortex and hippocampus. *Am J Pathol*, 146 (2):357-367.
- Giordano FJ. 2005. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*, 115 (3):500-508.
- Goth L, Eaton JW. 2000. Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet*, 356 (9244):1820-1821.
- Han J, Wang D, Yu B, Wang Y, Ren H, Zhang B, Wang Y, Zheng Q. 2014. Cardioprotection against ischemia/reperfusion by licochalcone B in isolated rat hearts. *Oxid Med Cell Longev*, 2014:134862.
- Hartwig K, Heidler T, Moch J, Daniel H, Wenzel U. 2009. Feeding a ROS-generator to *Caenorhabditis elegans* leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormesis. *Genes Nutr*, 4 (1):59-67.
- Hatfield DL, Gladyshev VN. 2002. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol*, 22 (11):3565-3576.
- Hepple RT. 2000. Skeletal muscle: microcirculatory adaptation to metabolic demand. *Med Sci Sports Exerc*, 32 (1):117-123.
- Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, Shah AM. 2003. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 41 (12):2164-2171.

Hill MF, Singal PK. 1996. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol*, 148 (1):291-300.

Ho YS, Magnenat JL, Gargano M, Cao J. 1998. The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 5:1219-1228.

Hunt CR, Sim JE, Sullivan SJ, Featherstone T, Golden W, Von Kapp-Herr C, Hock RA, Gomez RA, Parsian AJ, Spitz DR. 1998. Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res*, 58 (17):3986-3992.

Ijsselmuiden AJ, Musters RJ, de Ruiter G, van Heerebeek L, Alderse-Baas F, van Schilfgaarde M, Leyte A, Tangelder GJ, Laarman GJ, Paulus WJ. 2008. Circulating white blood cells and platelets amplify oxidative stress in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 5 (12):811-820.

Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. 2006. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci*, 1067:425-435.

Jiang Z, Akey JM, Shi J, Xiong M, Wang Y, Shen Y, Xu X, Chen H, Wu H, Xiao J, Lu D, Huang W, Jin L. 2001. A polymorphism in the promoter region of catalase is associated with blood pressure levels. *Hum Genet*, 109 (1):95-98.

Keller U. 2004. Wirkung oxidierte Fette auf das antioxidative Schutzsystem an Ratten und Meerschweinchen bei variierender Konzentration von Vitamin E und Vitamin C in der Diät. Dissertation.

Koch LG, Britton SL. 2001. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiol Genomics*, 5 (1):45-52.

Kohlhaas M, Maack C. 2013. Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovasc Res*, 98 (2):259-268.

Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zhehtab O, Guigo R, Gladyshev VN. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300 (5624):1439-1443.

Kubisch HM, Wang J, Luche R, Carlson E, Bray TM, Epstein CJ, Phillips JP. 1994. Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (21):9956-9959.

Lambert JH. 1760. *Photometria, sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae*. Sumptibus Vidae Eberhardi Klett, Augsburg.

Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. 2002. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*, 106 (24):3073-3078.

Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 71 (4):952-958.

Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Chen JC, Davis BH, Sim JE, Corry PM, Spitz DR. 1998. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *J Biol Chem*, 273 (9):5294-5299.

Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. 1995. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*, 91 (10):2642-2654.

Liu ZW, Zhu HT, Chen KL, Qiu C, Tang KF, Niu XL. 2013. Selenium attenuates high glucose-induced ROS/TLR-4 involved apoptosis of rat cardiomyocyte. *Biol Trace Elem Res*, 156 (1-3):262-270.

Lledias F, Rangel P, Hansberg W. 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem*, 273 (17):10630-10637.

Maack C, Bohm M. 2011. Targeting mitochondrial oxidative stress in heart failure throttling the afterburner. *J Am Coll Cardiol*, 58 (1):83-86.

Maack C, Cortassa S, Aon MA, Ganesan AN, Liu T, O'Rourke B. 2006. Elevated cytosolic Na<sup>+</sup> decreases mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circ Res*, 99 (2):172-182.

Maack C, Kartes T, Kilter H, Schafers HJ, Nickenig G, Bohm M, Laufs U. 2003. Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation*, 108 (13):1567-1574.

Majima HJ, Oberley TD, Furukawa K, Mattson MP, Yen HC, Szweda LI, St Clair DK. 1998. Prevention of mitochondrial injury by manganese superoxide dismutase reveals a primary mechanism for alkaline-induced cell death. *J Biol Chem*, 273 (14):8217-8224.

Malmgren R. G. Uo, et al. 1986. Lowered glutathione- peroxidase activity in asthmatic patients with food and aspirin intolerance. *Allergy*, 41:43- 45.

Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 47 (3):469-474.

Marklund SL. 1982. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79 (24):7634-7638.

- Marklund SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G. 1982. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res*, 42 (5):1955-1961.
- Mataix J, Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Manas M. 1998. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*, 24 (4):511-521.
- Matysiak R, Blaszczyk J, Obrebska A, Mejer A, Kozirog M, Kowalski J. 2014. [Oxidative-reductive balance in patients after acute coronary syndrome that undergo cardiac rehabilitation]. *Pol Merkur Lekarski*, 37 (219):148-152.
- Mayyas F, Alzoubi KH, Al-Taleb Z. 2017a. Impact of high fat/high salt diet on myocardial oxidative stress. *Clin Exp Hypertens*, 39 (2):126-132.
- Mayyas F, Alzoubi KH, Bonyan R. 2017b. The role of spironolactone on myocardial oxidative stress in rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Cardiovasc Ther*, 35 (2).
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244 (22):6049-6055.
- Meng LM, Ma HJ, Guo H, Kong QQ, Zhang Y. 2016. The cardioprotective effect of naringenin against ischemia-reperfusion injury through activation of ATP-sensitive potassium channel in rat. *Can J Physiol Pharmacol*, 94 (9):973-978.
- Mills GC. 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem*, 229 (1):189-197.
- Mills GC. 1959. The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J Biol Chem*, 234 (3):502-506.
- Mills GC, Randall HP. 1958. Hemoglobin catabolism. II. The protection of hemoglobin from oxidative breakdown in the intact erythrocyte. *J Biol Chem*, 232 (2):589-598.
- Mollnau H, Oelze M, August M, Wendt M, Daiber A, Schulz E, Baldus S, Kleschyov AL, Matern A, Wenzel P, Hink U, Nickenig G, Fleming I, Munzel T. 2005. Mechanisms of increased vascular superoxide production in an experimental model of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (12):2554-2559.
- Munzel T, Gori T, Keaney JF, Jr., Maack C, Daiber A. 2015. Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *Eur Heart J*, 36 (38):2555-2564.

Muthusamy VR, Kannan S, Sadhaasivam K, Gounder SS, Davidson CJ, Boeheme C, Hoidal JR, Wang L, Rajasekaran NS. 2012. Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. *Free Radic Biol Med*, 52 (2):366-376.

Navarro A, Boveris A. 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292 (2):C670-686.

Nelson DP, Kiesow LA. 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Anal Biochem*, 49 (2):474-478.

Nickel A, Kohlhaas M, Maack C. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *J Mol Cell Cardiol*, 73:26-33.

Offen D, Beart PM, Cheung NS, Pascoe CJ, Hochman A, Gorodin S, Melamed E, Bernard R, Bernard O. 1998. Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (10):5789-5794.

Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70 (1):158-169.

Pearson DJ, Suarez-Mendez VJ, Day JP, Miller PF. 1991. Selenium status in relation to reduced glutathione peroxidase activity in aspirin-sensitive asthma. *Clin Exp Allergy*, 21 (2):203-208.

Petyaev I, Mitchinson MM, Hunt JV, Coussons PJ. 1998. Superoxide dismutase activity of antibodies purified from the human arteries and atherosclerotic lesions. *Biochem Soc Trans*, 26 (1):S43.

Pieczenik SR, Neustadt J. 2007. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol*, 83 (1):84-92.

Pinho CA, Tromm CB, Tavares AM, Silva LA, Silveira PC, Souza CT, Benetti M, Pinho RA. 2012. Effects of different physical training protocols on ventricular oxidative stress parameters in infarction-induced rats. *Life Sci*, 90 (13-14):553-559.

Qu D, Han J, Ren H, Yang W, Zhang X, Zheng Q, Wang D. 2016. Cardioprotective Effects of Astragalin against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart. *Oxid Med Cell Longev*, 2016:8194690.

Ramasarma T, Rao AV, Devi MM, Omkumar RV, Bhagyashree KS, Bhat SV. 2015. New insights of superoxide dismutase inhibition of pyrogallol autoxidation. *Mol Cell Biochem*, 400 (1-2):277-285.

- Rjiba-Touati K, Ayed-Boussema I, Guedri Y, Achour A, Bacha H, Abid-Essefi S. 2016. Effect of recombinant human erythropoietin on mitomycin C-induced oxidative stress and genotoxicity in rat kidney and heart tissues. *Hum Exp Toxicol*, 35 (1):53-62.
- Roth EF, Jr., Gilbert HS. 1984. The pyrogallol assay for superoxide dismutase: absence of a glutathione artifact. *Anal Biochem*, 137 (1):50-53.
- Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. 1978. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*, 58 (6):1072-1083.
- Saotome M, Katoh H, Yaguchi Y, Tanaka T, Urushida T, Satoh H, Hayashi H. 2009. Transient opening of mitochondrial permeability transition pore by reactive oxygen species protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296 (4):H1125-1132.
- Schaun MI, Motta LL, Teixeira R, Klamt F, Rossato J, Lehn AM, Irigoyen MC, Markoski M. 2017. Preventive Physical Training Partially Preserves Heart Function and Improves Cardiac Antioxidant Responses in Rats After Myocardial Infarction. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*:1-20.
- Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. 2007. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Springer Berlin Heidelberg.
- Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS. 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*, 308 (5730):1909-1911.
- Singla DK, Kaur K, Sharma AK, Dhingra S, Singal PK. 2007. Probucol promotes endogenous antioxidant reserve and confers protection against reperfusion injury. *Can J Physiol Pharmacol*, 85 (3-4):439-443.
- Tappel AL. 1978. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol*, 52:506-513.
- Tian XH, Liu CL, Jiang HL, Zhang Y, Han JC, Liu J, Chen M. 2016. Cardioprotection provided by Echinatin against ischemia/reperfusion in isolated rat hearts. *BMC Cardiovasc Disord*, 16:119.
- Toppo S, Vanin S, Bosello V, Tosatto SC. 2008. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxid Redox Signal*, 10 (9):1501-1514.
- Tweedie C, Romestaing C, Burelle Y, Safdar A, Tarnopolsky MA, Seadon S, Britton SL, Koch LG, Hepple RT. 2011. Lower oxidative DNA damage despite greater ROS production in muscles from rats selectively bred for high running capacity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300 (3):R544-553.



- Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. 1985. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*, 839 (1):62-70.
- Utomo A, Jiang X, Furuta S, Yun J, Levin DS, Wang YC, Desai KV, Green JE, Chen PL, Lee WH. 2004. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 279 (42):43522-43529.
- Van Raamsdonk JM, Hekimi S. 2009. Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, 5 (2):e1000361.
- Vogt M, Bauer MK, Ferrari D, Schulze-Osthoff K. 1998. Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells. *FEBS Lett*, 429 (1):67-72.
- Wang P, Chen H, Qin H, Sankarapandi S, Becher MW, Wong PC, Zweier JL. 1998. Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (8):4556-4560.
- Weisiger RA, Fridovich I. 1973. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem*, 248 (13):4793-4796.
- Weiss RH, Estabrook RW. 1986. The mechanism of cumene hydroperoxide-dependent lipid peroxidation: the function of cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys*, 251 (1):348-360.
- Westman NG, Marklund SL. 1981. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase and manganese-containing superoxide dismutase in human tissues and human malignant tumors. *Cancer Res*, 41 (7):2962-2966.
- Weydert CJ, Cullen JJ. 2010. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc*, 5 (1):51-66.
- White CW, Avraham KB, Shanley PF, Groner Y. 1991. Transgenic mice with expression of elevated levels of copper-zinc superoxide dismutase in the lungs are resistant to pulmonary oxygen toxicity. *J Clin Invest*, 87 (6):2162-2168.
- Yan H, Harding JJ. 1997. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J*, 328 ( Pt 2):599-605.
- Yoshida T, Watanabe M, Engelman DT, Engelman RM, Schley JA, Maulik N, Ho YS, Oberley TD, Das DK. 1996. Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase are resistant to myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 28 (8):1759-1767.

## 10. Anhang

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Auszug aus dem antioxidativen Schutzsystem der Zelle nach Chow (1988).....	8
Abb. 2: Formel zur Berechnung der Katalaseaktivität .....	16
Abb. 3: Formel zur Berechnung der SOD- Aktivität .....	17
Abb. 4: Reaktionskreislauf zur Regeneration von zwei Glutathion Molekülen.....	17
Abb. 5: SOD- Aktivitäten in Herzproben des gleichen Tieres .....	20
Abb. 6: Auswirkungen unterschiedlicher Kalium Cyanid (KCN) Konzentrationen auf die Aktivität der SOD.....	20
Abb. 7: Gesamt- SOD- Aktivität im Herzmuskelgewebe von Sprague Dawley Ratten im Literaturvergleich .....	21
Abb. 8: Katalaseaktivität verschiedener Herzproben .....	22
Abb. 9: Kurvenverläufe der Absorption der Positivkontrolle .....	22
Abb. 10: Katalaseaktivität im Herzmuslgewebe von Sprague Dawley Ratten im Literaturvergleich .....	23
Abb. 11: Glutathion Peroxidaseaktivität verschiedener Herzproben .....	24
Abb. 12: Glutathion Peroxidaseaktivität im Herzmuskelgewebe von Sprague Dawley Ratten im Literaturvergleich .....	24
Abb. 13: Werte der Echokardiographie von HCR und LCR vor und nach Drucküberlastung .....	25
Abb. 14: Aktivitäten der Superoxid Dismutase in HCR und LCR vor und nach Drucküberlastung (TAC) .....	26
Abb. 15: Aktivitäten der Katalase in HCR und LCR vor und nach Drucküberlastung (TAC).....	27
Abb. 16: Aktivitäten der Glutathion Peroxidase in HCR und LCR vor und nach Drucküberlastung (TAC).....	27

### 10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Absorptionsänderung der Positivkontrolle.....	22
---	----

### 10.3 Protokoll Glutathion Peroxidase

#### 1. Materialien, Geräte, Chemikalien und Lösungen

##### 1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- 15 ml Falcon Tubes
- Handschuhe
- Mörser und Spatel
- Analysewaage/ Feinwaage
- Vortexer
- Homogenisator
- Zentrifuge (auf 4°C kühlbar, mindestens 10000 x g erreichen)
- Pipetten und Spitzen für verschiedene Volumina
- Magnetrührer und Rührfisch
- 96-Well Platte (Greiner bio-one,655101)
- Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek)
- 10ml, 50 ml und 100 ml Maßkolben
- 50 ml und 100 ml Bechergläser
- 3 x Aufbewahrungsflasche für Puffer (2x 50 ml, 1x 100 ml)

##### 1.2 Chemikalien

Stoff	Hersteller und Produktnummer
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Ailied Signal 30407
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	MERCK A604404
Tris- HCl	Roth 9090.3
EDTA	Roth 8043.3
Glutathion Reduktase	Sigma Aldrich G3664
Glutathion reduced	Sigma G4251- 300 MG
NADPH	Sigma 93025-1G
Cumene Hydroperoxide (80%)	Sigma Aldrich 247502
1 M KOH	
Aqua dest.	

### 1.3 Lösungen

#### 1.3.1 Lyse- Puffer

Für 100 ml Lyse- Puffer	Endkonzentration
40 ml Aqua dest. vorlegen	
1,3609 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ einwiegen und zugeben	0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$
74,45 mg EDTA einwiegen und zugeben	2 mM EDTA
2 Protease Inhibitor Tabletten zur Stabilisierung zugeben	
pH- Wert mit 1 M KOH auf 7,4 einstellen	
mit Aqua dest. im Maßkolben auf 50 ml auffüllen und in Flasche umfüllen	
bei 4 °C für 3 Monate haltbar	

#### 1.3.2 Tris- Puffer

Für 100 ml Tris- Puffer	Endkonzentration
50 ml Aqua dest. vorlegen	
788 mg Tris- HCl einwiegen und zugeben	50 mM Tris- HCL
10 ml 10 mM EDTA in Aqua dest. geben	0,1 mM EDTA
pH- Wert mit 1 M KOH auf 7,6 einstellen	
mit Aqua dest. im Maßkolben auf 100 ml auffüllen und in Flasche umfüllen	
bei 4 °C für 2 Monate haltbar	

#### 1.3.3 Cumene Hydroperoxide

Für 10 ml Cumene Hydroperoxide	Endkonzentration
2216,4 µl Cumene- Hydroperoxide (80%) mit 7783,6 µl Aqua dest vermischen → Vor jedem Versuch neu herstellen	1,5 mM Cumene- Hydroperoxide

## 1.3.4 Assay- Puffer

Für 30 ml Assay- Puffer	Endkonzentration
10 ml Tris- Puffer vorlegen	
4,72 mg NADPH einwiegen und zugeben	0,2 mM NADPH
82,976 mg GSH einwiegen und zugeben	9 mM GSH
882,354 µl Glutathion Reduktase (GR) zugeben	7,5 U/ml GR
mit Tris- Puffer im Maßkolben auf 30 ml auffüllen und in Flasche oder Falcon umfüllen	
bei 4 °C lagern	

-

2 **Probenvorbereitung**

- Herz in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser zerkleinern und in ein geeignetes Lagergefäß mit Hilfe eines gekühlten Spatels überführen
- Aufbewahrung des gemörserten Herzens bei -80°C, Transport und Einwaage nur in flüssigem Stickstoff
- Herstellung des Proben- Homogenates
  - o 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Analysewaage stellen -> Tara
  - o Spatel in flüssigem N<sub>2</sub> kühlen
  - o Herzpulver aus flüssigem N<sub>2</sub> nehmen, runterklopfen und mit N<sub>2</sub> gekühltem Spatel 50 mg Herzpulver in Reaktionsgefäß überführen
  - o Herzpulver sofort zurück in flüssigem N<sub>2</sub>
  - o gekühlten Lyse- Puffer auf das Herzpulver geben (**1 mg Gewebe/10 µl Lyse-Puffer**)
  - o kurz schütteln oder mischen auf Vortexer, danach auf Eis aufbewahren
  - o mittels Homogenisator bei 750 rpm für 30 sec. homogenisieren (währenddessen auf Eis lagern um zu starke Wärmeentwicklung zu vermeiden)
- Zentrifuge auf 4°C kühlen und für 15 Minuten bei 10000 x g zentrifugieren
- Überstand abnehmen und in ein neues, beschriftetes Reaktionsgefäß überführen, Pellet verwerfen
- Wenn Assay nicht am gleichen Tag durchgeführt wird bei -20°C lagern

### 3 Vorbereitung

- Cumene Hydroperoxide und Assay Puffer vorbereiten
- Proben auftauen und auf Eis lagern

### 4 Assay durchführen

- Microplate- Reader vorbereiten
  - o Gerät und PC einschalten
  - o Programm Gen 5 öffnen -> Experiment -> GPx Assay
    - Protocol
      - Procedure:
        - „Temperature Setpoint: 37°C“
        - „plate in“
        - „start kinetic [Run 00:10:00, Intervall 0:02:00]
          - „read 340“
        - „end kinetic“
        - „plate out, Add 10 µl Cumene“
        - „start kinetic [Run 00:03:00, Intervall 0:00:15]
          - „read: 340“ <sup>[1]</sup>
        - „end kinetic“
        - „read: 412“ <sup>[2]</sup>
        - „plate out“
      - Plate Layout: Blank und Proben festlegen

[1] Doppelklick auf den Read Schritt → aufgrund der kinetischen Messung kann im Intervall nicht gesamte Platte gemessen werden → im Fenster rechts oben auf Kästchen klicken und pipettierte Wells als zu messende festlegen

[2] Doppelklick auf Read Schritt → Haken im Feld „Pathlength correction“ [Test: 977, Reference: 900, Absorbance: 0,18]

- Wells pipettieren
  - o **Assay wird in Doppelbestimmung durchgeführt**
  - o in Proben- Wells 15 µl der unverdünnten Probe pipettieren
  - o 200 µl des Assay Puffer in die Proben- Wells geben
  - o in Blank Wells 225 µl Assay- Puffer pipettieren
- 96- Well Platte direkt in Microplate Reader stelle

- „Read Plate“ drücken
- **Inkubation im Reader bei 37 °C für 10 Minuten**
- Wenn nach 10 Minuten das Dialogfeld erscheint in alle (**außer Blank!**) so schnell wie möglich *10 µl Cumene Hydroperoxide* pipettieren um die Reaktion einzuleiten
- In jedem Well müssen 225 µl sein
- Es wird für 3 Minuten gemessen

## 5 Auswertung

- schauen ob unter „Curves“ alle Kurven exponentiell fallen
- „Blank 340 nm“ nach 0 sec., „Blank 340 nm“ nach 3 Minuten, „Pathlength“ in Excel übertragen
- Mittels der Formel die Aktivität in Units berechnen:

$$\text{Aktivität in } U = \frac{(\Delta E * V)}{t * \varepsilon * d}$$

- $T = \text{Zeit in sec}$
  - $\varepsilon = \text{molarer Extinktionskoeffizient für NADPH bei 340 nm } (0,0062 \mu \frac{\text{mol}}{\text{l*cm}})$
  - $\Delta E = \text{Extinktionsabnahme über 3 Minuten}$
  - $d = \text{Schichtdicke in cm}$
  - $V = \text{Gesamtvolumen in l } (0,000225)$
- Zum Ende noch Proteinmenge mittels folgender Formel einberechnen (**vorher Bradford- Bestimmung durchführen**) :

$$\frac{\text{Aktivität in } U}{(\text{Proteinmenge in } \frac{\text{mg}}{\text{ml}} * 0,015)} = \text{Aktivität in } \frac{U}{\text{mg Protein}}$$

- Es können auch andere Zeitpunkte verwendet werden! (t in Formel muss geändert werden!)

## 10.4 Protokoll Superoxid Dismutase

### 1. Materialien, Geräte, Chemikalien und Lösungen

#### 1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Handschuhe
- Mörser und Spatel
- Analysewaage/ Feinwaage
- Vortexer
- Homogenisator
- Zentrifuge (auf 4°C kühlbar, mindestens 3000x g erreichen)
- Pipetten und Spitzen für verschiedene Volumina
- Magnetrührer und Rührfisch
- 96-Well Platte (Greiner bio-one,655101)
- Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek)
- 50 ml Maßkolben
- 50, 250 ml Bechergläser
- 3 x Aufbewahrungsflasche für Puffer (50, 250 ml Puffer)

#### 1.2 Chemikalien

Stoff	Hersteller und Produktnummer
Aqua dest.	
Pyrogallol	Sigma P0381- 25 G
Tris- HCl	Roth 9090.3
1 M KOH	
37 % HCl.	
KCN	Sigma 31252- 100 G
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Allied Signal 30407
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MERCK A604404
EDTA	Roth 8043.3



### 1.3 Lösungen

#### 1.3.1 Lyse- Puffer

Für 100 ml Lyse- Puffer	Endkonzentration
40 ml Aqua dest. vorlegen	
1,3609 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ einwiegen und zugeben	0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$
74,45 mg EDTA einwiegen und zugeben	2 mM EDTA
2 Protease Inhibitor Tabletten zur Stabilisierung zugeben	
pH- Wert mit 1 M KOH auf 7,4 einstellen	
mit Aqua dest. im Maßkolben auf 50 ml auffüllen und in Flasche umfüllen	
bei 4 °C für 3 Monate haltbar	

#### 1.3.2 Tris- Puffer

Für 250 ml Tris- Puffer	Endkonzentration
100 ml Aqua dest. vorlegen	
1,97 g Tris- HCl einwiegen und zugeben	50 mM Tris- HCL
pH- Wert mit 1 M KOH auf 8,5 einstellen	
mit Aqua dest. im Maßkolben auf 250 ml auffüllen und in Flasche umfüllen	
bei 4 °C für 2 Monate haltbar	

#### 1.3.3 Pyrogallol

Für 50 ml Pyrogallol	Endkonzentration
25 ml Aqua dest. vorlegen	
41,5 µl 37% HCL zugeben	10 mM HCL
50,44 mg Pyrogallol einwiegen und zugeben	8 mM Pyrogallol
mit Aqua dest. im Maßkolben auf 50 ml auffüllen und in Flasche umfüllen	
bei 4 °C für 1 Woche haltbar	

## 1.3.4 KCN- Stock

Für 10 ml KCN- Stock	Endkonzentration
5 ml Aqua dest. vorlegen	
130,24 <b>mg</b> KCN einwiegen und zugeben	0,2 M KCN
mit Aqua dest. im Maßkolben auf 10 ml auffüllen und in Flasche umfüllen	
bei 4 °C lagern	

## 1.3.5 KCN- Inhibitor

- 100 µl des 0,2 M Stock in 9,9 ml Aqua dest. geben um 2 mM KCN- Inhibitor herzustellen
- Immer frisch ansetzen vor Messung

**2. Probenvorbereitung**

- Herz in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser zerkleinern und in ein geeignetes Lagergefäß mit Hilfe eines gekühlten Spatels überführen
- Aufbewahrung des gemörserten Herzens bei -80°C, Transport und Einwaage nur in flüssigem Stickstoff
- Herstellung des Proben- Homogenates
  - o 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Analysewaage stellen -> Tara
  - o Spatel in flüssigem N<sub>2</sub> kühlen
  - o Herzpulver aus flüssigem N<sub>2</sub> nehmen, runterklopfen und mit N<sub>2</sub> gekühltem Spatel 50 mg Herzpulver in Reaktionsgefäß überführen
  - o Herzpulver sofort zurück in flüssigem N<sub>2</sub>
  - o gekühlten Lyse- Puffer auf das Herzpulver geben (**1 mg Gewebe/10 µl Lyse- Puffer**)
  - o kurz schütteln oder mischen auf Vortexer, danach auf Eis aufbewahren
  - o mittels Homogenisator bei 750 rpm für 30 sec. homogenisieren (währenddessen auf Eis lagern um zu starke Wärmeentwicklung zu vermeiden)
- Zentrifuge auf 4°C kühlen und für 5 Minuten bei 5616 rpm (=3000 x g) zentrifugieren
- Überstand abnehmen und in ein neues, beschriftetes Reaktionsgefäß überführen, Pellet verwerfen
- Wenn Assay nicht am gleichen Tag durchgeführt wird bei -20°C lagern

### 3. Vorbereitung

- Pyrogallol und KCN- Inhibitor vorbereiten
- Proben auftauen und auf Eis lagern

### 4. Assay durchführen

- Microplate- Reader vorbereiten
  - o Gerät und PC einschalten
  - o Programm Gen 5 öffnen -> Experiment -> SOD Assay Pyrogallol
    - Protocol
      - Procedure:
        - „Temperature Setpoint: 25°C“
        - „plate in“
        - „start kinetic [Run 00:02:00, Intervall 0:00:15]
          - „read: 420“ <sup>[1]</sup>
        - „end kinetic“
        - „plate out“
      - Plate Layout: Blank und Proben festlegen

[1] Doppelklick auf den Read Schritt → aufgrund der kinetischen Messung kann im Intervall nicht gesamte Platte gemessen werden → im Fenster rechts oben auf Kästchen klicken und pipettierte Wells als zu messende festlegen

- Wells pipettieren (**ohne Inhibitor**)
  - o **Assay wird in Doppelbestimmung durchgeführt**
  - o 10 µl unverdünnte Probe in Proben- Wells, 10 µl Aqua dest. in 100%- Well pipettieren
  - o 280 µl Tris- Puffer in alle zu messenden Wells geben
  - o 300 µl Tris- Puffer als Blank pipettieren
  - o **10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren**
  - o in alle Wells so schnell wie möglich 10 µl Pyrogallol pipettieren um die Reaktion einzuleiten
  - o in jedem Well müssen 300 µl sein
- 96- Well Platte direkt in Microplate Reader stellen
- „Read Plate“ drücken
- Es wird für 2 Minuten gemessen

- Wells pipettieren (**mit Inhibitor**)
  - **Assay wird in Doppelbestimmung durchgeführt**
  - 10 µl unverdünnte Probe+ 10 µl KCN- Inhibitor in Proben- Wells und 10 µl Aqua dest.+ 10 µl KCN- Inhibitor in 100%- Well pipettieren
  - 270 µl Tris- Puffer in alle zu messenden Wells geben
  - 300 µl Tris- Puffer als Blank pipettieren
  - **10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren**
  - in alle Wells so schnell wie möglich 10 µl *Pyrogallol* pipettieren um die Reaktion einzuleiten
  - in jedem Well müssen 300 µl sein
- 96- Well Platte direkt in Microplate Reader stellen
- „Read Plate“ drücken
- Es wird für 2 Minuten gemessen

## 5. Auswertung

- schauen ob unter „Curves“ alle Kurven ansteigen
- „Blank 420 nm“ nach 0 sec., „Blank 420 nm“ nach 2 Minuten in Excel übertragen
- Mittels der Formel die Aktivität in U/ml berechnen:

$$SOD \text{ Aktivität in } \frac{U}{ml} = \frac{(\Delta I_{100\%} - \Delta I_{Probe}) * V_{gesamt}}{v_{Probe} * (\frac{\Delta I_{100\%}}{2})}$$

- $\Delta I_{100\%}$  = Extinktionszunahme des 100%- Wells über 2 Minuten
  - $\Delta I_{Probe}$  = Extinktionszunahme der Probe über 2 Minuten
  - $V_{gesamt}$  = Gesamtvolumen (0,3 ml)
  - $v_{Probe}$  = Probenvolumen (mit Inhibitor = 0,02 ml; ohne Inhibitor = 0,01 ml)
- Proteinmenge mittels Bradford- Proteinbestimmung erfassen, um Aktivität in U/ mg Protein angeben zu können

## 10.5 Protokoll Katalase

### 1. Materialien, Geräte, Chemikalien und Lösungen

#### 1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- 15 ml Falcon Tubes
- Handschuhe
- Mörtser und Spatel
- Analysewaage/ Feinwaage
- Vortexer
- Homogenisator
- Zentrifuge (auf 4°C kühlbar, mindestens 3000x g erreichen)
- Pipetten und Spitzen für verschiedene Volumina
- Magnetrührer und Rührfisch
- 96-Well Platte (Greiner bio-one,655801) UV- Platten!
- Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek)
- 100 ml Maßkolben
- 100 ml Bechergläser
- 3 x Aufbewahrungsflasche für Puffer (100 ml und 50 ml))

#### 1.2 Chemikalien

Stoff	Hersteller und Produktnummer
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Allied Signal 30407
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	MERCK A604404
30 % $\text{H}_2\text{O}_2$	Roth CP26.1
Catalase preparation <i>Aspergillus niger</i>	Sigma C <sub>16</sub> K3789
Aqua dest.	
EDTA	Roth 8043.3
1 M KOH	

### 1.3 Lösungen

#### 1.3.1 Lyse- Puffer

Für 100 ml Lyse- Puffer	Endkonzentration
40 ml Aqua dest. vorlegen	
1,3609 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ einwiegen und zugeben	0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$
74,45 mg EDTA einwiegen und zugeben	2 mM EDTA
2 Protease Inhibitor Tabletten zur Stabilisierung zugeben	
pH- Wert mit 1 M KOH auf 7,4 einstellen	
mit Aqua dest. im Maßkolben auf 50 ml auffüllen und in Flasche umfüllen	
bei 4 °C für 3 Monate haltbar	

#### 1.3.2 Phosphat- Puffer

Für ca. 50 ml Phosphat- Puffer	Endkonzentration
<b>1. 10 ml <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> herstellen (I)</b>	
5 ml Aqua dest. vorlegen	
1,361 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ einwiegen und zugeben	1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$
mit Aqua dest. im Maßkolben auf 10 ml auffüllen	
<b>2. 50 ml <math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math> herstellen (II)</b>	
20 ml Aqua dest. vorlegen	
8,71 g $\text{K}_2\text{HPO}_4$ einwiegen und zugeben	1 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$
mit Aqua dest. im Maßkolben auf 50 ml auffüllen	
<b>3. So lange Lösung I zu II geben, bis pH- Wert bei 7,8 liegt, Rest von Lösung I verwerfen // in Flasche umfüllen und beschriften, bei 4 ° C 6 Monate haltbar</b>	

### 1.3.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- in Falcon Tube 10 ml Phosphat- Puffer vorlegen
- 30 µl von 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugeben

### 1.3.4 Positiv Kontrolle

- *Aspergillus niger* Katalase verwenden (4550 U/mg bei 35,8 mg/ml)
- 10 µl in 990 µl Phosphat- Puffer geben (1628,9 U/ml)
- von 1628,9 U/ml Stock 245,56 µl in 754,44 µl Phosphat- Puffer geben um 400 U/ml positiv Kontrolle zu erhalten // wird bei 4 °C im Kühlschrank gelagert
- vor Gebrauch auf Eis lagern
- wenn Messung abgeschlossen positiv Kontrolle bei 4 °C lagern

## 2. Probenvorbereitung

- Herz in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser zerkleinern und in ein geeignetes Lagergefäß mit Hilfe eines gekühlten Spatels überführen
- Aufbewahrung des gemörserten Herzens bei -80°C, Transport und Einwaage nur in flüssigem Stickstoff
- Herstellung des Proben- Homogenates
  - o 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Analysewaage stellen -> Tara
  - o Spatel in flüssigem N<sub>2</sub> kühlen
  - o Herzpulver aus flüssigem N<sub>2</sub> nehmen, runterklopfen und mit N<sub>2</sub> gekühltem Spatel 50 mg Herzpulver in Reaktionsgefäß überführen
  - o Herzpulver sofort zurück in flüssigem N<sub>2</sub>
  - o gekühlten Lyse- Puffer auf das Herzpulver geben (**1 mg Gewebe/10 µl Lyse- Puffer**)
  - o kurz schütteln oder mischen auf Vortexer, danach auf Eis aufbewahren
  - o mittels Homogenisator bei 750 rpm für 30 sec. homogenisieren (währenddessen auf Eis lagern um zu starke Wärmeentwicklung zu vermeiden)
- Zentrifuge auf 4°C kühlen und für 5 Minuten bei 5616 rpm (=3000 x g) zentrifugieren
- Überstand abnehmen und in ein neues, beschriftetes Reaktionsgefäß überführen, Pellet verwerfen
- Wenn Assay nicht am gleichen Tag durchgeführt wird bei -20°C lagern

## 3. Vorbereitung

- Proben auftauen und auf Eis lagern
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie positiv Kontrolle vorbereiten

#### 4. Assay durchführen

- Microplate- Reader vorbereiten
  - Gerät und PC einschalten
  - Programm Gen 5 öffnen -> Experiment -> Katalase Assay
    - Protocol
      - Procedure:
        - „plate in“
        - „start kinetic [Run 00:02:00, Intervall 0:00:15]
          - „read: 240“ <sup>[1]</sup>
        - „end kinetic“
        - „read: 412“ <sup>[2]</sup>
        - „plate out“
- Plate Layout: Blank, positiv Kontrolle und Proben festlegen

**[1]** Doppelklick auf den Read Schritt → aufgrund der kinetischen Messung kann im Intervall nicht gesamte Platte gemessen werden → im Fenster rechts oben auf Kästchen klicken und pipettierte Wells als zu messende festlegen

**[2]** Doppelklick auf Read Schritt → Haken im Feld „Pathlength correction“ [Test: 977, Reference: 900, Absorbance: 0,18]

- Wells pipettieren
  - UV- Platte verwenden!!!!
  - **Assay wird in Doppelbestimmung durchgeführt**
  - 5 µl unverdünnte Probe in Proben- Wells und positiv Kontroll- Wells pipettieren
  - 45 µl Phosphat- Puffer in alle zu messenden Wells geben
  - in Blank Wells 150 µl Phosphat- Puffer pipettieren
  - in alle (**außer Blank!**) so schnell wie möglich 100 µl des  $H_2O_2$  pipettieren um die Reaktion einzuleiten
  - in jedem Well müssen 150 µl sein
- 96- Well Platte direkt in Microplate Reader stellen (Reaktion wird im Reader inkubiert)
- „Read Plate“ drücken
- Es wird für 2 Minuten gemessen



### 5. Auswertung

- schauen ob unter „Curves“ alle Kurven exponentiell fallen
- „Blank 240 nm“ nach 0 sec., „Blank 240 nm“ nach 2 Minuten, „Pathlength“ in Excel übertragen
- Mittels der Formel die Aktivität in Katal berechnen:

$$\text{Aktivität in Katal} = \frac{(\Delta E * V)}{t * \epsilon * d}$$

- $T = \text{Zeit in sec}$
- $\epsilon = \text{molarer Extinktionskoeffizient für Wasserstoffperoxid bei 240 nm } (43,6 \frac{\text{Mol}}{\text{l*cm}})$
- $\Delta E = \text{Extinktionsabnahme über 2 Minuten}$
- $d = \text{Schichtdicke in cm}$
- $V = \text{Gesamtvolumen in l } (0,00015)$
- Zum Ende noch Proteinmenge mittels folgender Formel einberechnen (**vorher Bradford- Bestimmung durchführen**):

$$\frac{\text{Aktivität in U}}{(\text{Proteinmenge in } \frac{\text{mg}}{\text{ml}} * 0,005)} = \text{Aktivität in } \frac{\text{U}}{\text{mg Protein}}$$

- Die Aktivität kann mittels der Multiplikation von 60 auch in Units umgerechnet werden

## 10.6 Danksagung

Schreiben musste ich diese Arbeit zwar allein – doch an ihrem guten Gelingen beteiligt waren jede Menge Personen, denen ich Dank schulde.

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Torsten Doenst für die Möglichkeit diese Arbeit in der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie anzufertigen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Michael Schwarzer für die Übernahme der Betreuung sowie allen Mitarbeitern der Forschungsabteilung der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie für die zahlreichen Denkanstöße, das Feedback und die Hilfe bei der Lösung verschiedener Probleme. Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Christina Schenkl. Durch ihre sehr gute Betreuung, ihre Ideen sowie ihre ehrliche Kritik war die Anfertigung der Arbeit überhaupt möglich. Für diese Ehrlichkeit und die Kollegialität bin ich sehr dankbar.

Ebenfalls möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Zu jeder Zeit konnte ich mich auf ihre Unterstützung egal in welcher Hinsicht verlassen. Hat mich die Motivation verlassen, waren sie es die mir halfen neue Kraft zu tanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Freundin Diana Borger bedanken. Danke, dass du dir meine Probleme angehört hast. Danke, dass du mit viel Geduld zugehört und mich unterstützt hast. Danke, dass ich mich immer auf deine Hilfe, Meinung und Unterstützung verlassen kann. Und besonders danke ich dir dafür, dass du mich immer wieder motiviert hast weiter zu machen.

### 10.7 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich Schiller Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind.

Folgende Personen haben mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Torsten Doenst, Herr Dr. rer. nat. Michael Schwarzer, Frau Christina Schenkl.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Des Weiteren bestätige ich, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers